

VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

FACULTAT DE MEDICINA I ODONTOLOGIA

Departament de Medicina

Programa de doctorado 3139 Medicina (RD 99/2011)



**IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES INMUNES
Y ANÁLISIS DE SU VALOR PRONÓSTICO
EN CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO**

TESIS DOCTORAL

Martín Núñez Abad

DIRECTORAS:

Vega Iranzo González-Cruz

Silvia Calabuig Fariñas

TUTOR:

Carlos Camps Herrero

València, noviembre de 2023

VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Facultat de Medicina i Odontologia. Universitat de València.

Servicio de Oncología Médica. Hospital General Universitario de València.

Fundació Investigació Hospital General Universitari de València.

IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES INMUNES Y ANÁLISIS DE SU VALOR PRONÓSTICO EN CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA



FUNDACIÓ
INVESTIGACIÓ
HOSPITAL GENERAL
UNIVERSITARI
VALÈNCIA

TESIS DOCTORAL

Martín Núñez Abad

Dirigida por:

Vega Iranzo González-Cruz

Silvia Calabuig Fariñas

Carlos Camps Herrero

València, noviembre de 2023

CERTIFICADO DE IDONEIDAD

Dña. **Vega Iranzo González-Cruz**, Doctora en Biotecnología por la Universitat Politècnica de València, Profesora Asociada Universitaria del Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València.

Dña. **Silvia Calabuig Fariñas**, Doctora en Biología por la Universitat de València, Profesora Ayudante Doctor del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València.

D. **Carlos Camps Herrero**, Doctor en Medicina por la Universitat de València, Catedrático del Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València.

Certifican que:

D. **Martín Núñez Abad**, graduado en Medicina por la Universidad de Santiago de Compostela, ha realizado, bajo su dirección el trabajo de investigación titulado: *“Identificación de biomarcadores inmunes y análisis de su valor pronóstico en cáncer de mama triple negativo”*, para optar al grado de Doctor en Medicina por la Universitat de València, y exponen que reúne los requisitos necesarios para su presentación y lectura.

VEGA|
IRANZO|
GONZAL
EZ-CRUZ

Firmado digitalmente por
VEGA|IRANZO|
GONZALEZ-CRUZ
Fecha: 2023.10.19
15:53:30 +02'00'

SILVIA
CALABUIG
FARIÑAS -
NIF:39723
475Z

Firmado digitalmente por
SILVIA CALABUIG FARIÑAS -
NIF:39723475Z
Nombre de reconocimiento
(DN): cn=SILVIA CALABUIG
FARIÑAS - NIF:39723475Z,
serialNumber=39723475Z,
givenName=SILVIA,
sn=CALABUIG FARIÑAS,
ou=CIUDADANOS, o=ACCV,
c=ES
Fecha: 2023.10.19 14:49:20
+02'00'

Firmado por CARLOS JESUS CAMPS
HERRERO - DNI ***1701** el día
24/10/2023 con un certificado
emitido por ACCVCA-120

València, 24 de octubre de 2023

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a cada una de las personas que me han acompañado durante la realización de este trabajo, con una especial dedicación y mención:

A mis directoras y tutor de tesis:

La Dra. Vega Iranzo y la Dra. Silvia Calabuig, unas profesionales y personas increíbles, que han ido coordinando todo el trabajo y sin las cuales este proyecto hubiese sido imposible.

El profesor Carlos Camps por su experiencia, sus consejos, su exigencia, porque siempre nos ha motivado para seguir aprendiendo y a superarnos.

A mi familia:

A mis padres, Tere y Pepe, que han sido mi apoyo incondicional durante todos estos años, inculcándome el valor del esfuerzo, la humildad, la empatía y la perseverancia para lograr los objetivos que me proponía y que me han servido de referentes. A mi hermana Carmen, que ha tenido que aguantarme mucho tiempo y siempre ha estado defendiéndome.

A mis tíos, a mis primos, y en especial a mi madrina Lourdes. A mis abuelos, que allá donde estén, sé que se sentirían orgullosos del trabajo realizado y de especializarme en algo tan bonito, pero a veces tan duro como es la Oncología.

A mi pareja:

Miriam, por la cual he decidido aventurarme a vivir en pareja y a crear un futuro juntos. Gracias por formar parte de mi día a día.

A mis amigos:

Ellos, que a lo largo de estos años han estado apoyándome en diferentes momentos de mi vida. Desde los que conocí de pequeño en mi ciudad natal, Ourense (Wilson, Noelia, Lucía, Noemi, Borja, Olalla, Manu); hasta los que aparecieron gracias a la Universidad de Santiago de Compostela (Di María, Miguel, Guille, Bobi); y la gente que me encontré debido a mis incursiones por el mundo como el Erasmus en Cracovia con mi

gran pilar Alejandra o el SICUE que realicé en Málaga donde conocí a personas tan maravillosas como Espe y Edu. Sé que me olvido de mencionar a muchos amigos y compañeros con los que he pasado grandes momentos, pero también me gustaría agradecerles a ellos el haber llegado hasta aquí.

A todos los residentes del HGUV y también de otros hospitales (Kevin, Neus, Eva, Jorge, Vega, Hugo, Bianca...). A la que ha sido mi compañera de piso durante la residencia, Patri, que desde que la conocí aportó más alegría a mi vida y ha sido mi colega de batallas en estos últimos años.

A mis compañeros de trabajo:

Agradecer también al personal de Oncología médica del HGUV y del Hospital Universitario de La Ribera, y en especial, a la mejor secretaria de todas, Isabel.

Mi reconocimiento a Susana Torres y al Dr. José Ángel García por su importante labor para sacar este trabajo adelante.

Mención aparte para todos los residentes de Oncología (Claudio, Amaya, Mila, Clara, Vicente, Javi, Lucas, Candela, Laura, Pablo, Palao...), los cuales hemos formado un grupo increíble y juntos sufrimos el rigor de nuestro trabajo, pero sobre todo hemos reído y vivido muchas anécdotas.

Por último, dar las gracias a Valencia, tierra de las flores, de la luz y del amor; que me ha acogido durante mi etapa como residente de Oncología médica, y que siempre tendrá un lugar en mi corazón.

ABREVIATURAS Y SIGLAS

AC: antraciclina + ciclofosfamida.

AJCC: *American Joint Committee on Cancer*.

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

AUC: Área bajo la curva.

BAG: Biopsia con aguja gruesa.

BL1 y BL2: Tipo basal 1 y 2.

BRCA1 y BRCA2: *Breast Cancer 1/2*.

CA 15-3: antígeno carbohidratado 15-3.

CBDA: Carboplatino.

CDI: Carcinoma ductal infiltrante.

CK19: Citoqueratina 19.

CLI: Carcinoma lobulillar infiltrante.

CM: Cáncer de mama.

CMTN: Cáncer de mama triple negativo.

CTCs: Células tumorales circulantes.

ctADN: Ácido desoxirribonucleico tumoral circulante.

CTLA-4: Proteína 4 asociada a los linfocitos T citotóxicos.

CSF: Factores estimulantes de las colonias.

EDTA: ácido etilenodiaminatetraacético.

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico.

FISH: Análisis por hibridación fluorescente in situ.

FOXP3: Proteína P3 de la *Forkhead box*.

FGFR: Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos.

GAL-3: Galectina-3.

GM-CSF: Colonias de Granulocitos y Macrófagos.

HAD: Herencia autosómica dominante.

H-E: Hematoxilina-eosina.

HER2: Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2.

HER2 low: Baja expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2.

HGR: Hospital General de Requena.

HGUV: Hospital General Universitario de Valencia.

HT: Hormonoterapia.

IDO1: Indolamina 2,3-dioxigenasa 1.

IFN: Interferon.

IHQ: Inmunohistoquímica.

IFN- γ : Interferón gamma.

IL: Interleucinas.

IM: Subtipo Inmunomodulador.

IMC: Índice de masa corporal.

Ki-67: Antígeno KI-67.

MIP-3 α : Producción de proteína inflamatoria de macrófagos 3 α .

NCOA: Coactivador de receptor nuclear 1.

NGS: *Next Generation Sequencing*.

NK: del inglés, *Natural Killer*. Linfocitos citolíticos naturales.

NCCN: del inglés, *National Comprehensive Cancer Network*.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

OSNA: *One-step Nucleic Acid Amplification*.

PAAF: Punción-aspiración con aguja.

PARP: Poli ADP ribosa polimerasa.

PD-L1: Ligando de la proteína transmembrana de tipo 1.

PET-TC: Tomografía por emisión de positrones – tomografía computada.

PI3K: Fosfatidil inositol-3 quinasa.

PTEN: Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa.

QT: Quimioterapia.

QTN: Quimioterapia neoadyuvante.

RA: Receptor de andrógenos.

RCB: *Residual cancer burden*.

RCp: Respuesta completa patológica.

RE: Receptor de estrógenos.

RH: Receptores hormonales.

RPg: Receptor de progesterona.

RT: Radioterapia.

sBTLA: Atenuador de linfocitos B y T soluble.

sCD27: Grupo de diferenciación 27 soluble.

sCD28: Grupo de diferenciación 28 soluble.

sCD40: Grupo de diferenciación 40 soluble.

sCD80/B7-1: Grupo de diferenciación 80 soluble.

sCD86/B7-2: Grupo de diferenciación 86 soluble.

sCTLA-4: Antígeno 4 del linfocito T citotóxico soluble.

sCX3CL1: Fractalquina soluble.

sCXCL-11: Citoquina 11 C-X-C soluble.

SG: Supervivencia global.

sGal-3: Galectina-3 soluble.

sGITR: Glucocorticoide inducido TNFR relacionado soluble.

sGITRL: Ligando de glucocorticoide inducido TNFR relacionado soluble.

sGM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos soluble.

sHVEM: Mediador de entrada del virus del herpes soluble.

sICOS: Coestimulador inducible soluble.

sIFN- γ : Interferón gamma soluble.

sIL-1 β : Interleuquina 1-Beta soluble.

sIL-2: Interleuquina 2 soluble.

sIL-4: Interleuquina 4 soluble.

sIL-5: Interleuquina 5 soluble.

sIL-6: Interleuquina 6 soluble.

sIL-7: Interleuquina 7 soluble.

sIL-8: Interleuquina 8 soluble.

sIL-10: Interleuquina 10 soluble .

sIL-12: Interleuquina 12 soluble.

sIL-13: Interleuquina 13 soluble.

sIL-17A: Interleuquina 17A soluble.

sIL-21: Interleuquina 21 soluble.

sIL-23: Interleuquina 23 soluble.

sITAC: Quimioatrayente alfa de células T inducible por interferón soluble.

sLAG3: Activación de linfocitos 3 soluble.

sMIP-1 α : Proteína inflamatoria de macrófagos 1 α soluble.

sMIP-3 α : Proteína inflamatoria de macrófagos 3 α soluble.

sMIP-1 β : Proteína inflamatoria de macrófagos 1 β soluble.

sPD-1: Proteína de muerte celular programada-1 soluble.

sPD-L1: Ligando de la proteína de muerte celular programada-1 soluble.

sPD-L2: Ligando 2 de la proteína de muerte celular programada-1 soluble.

sTLR-2: Receptores tipo Toll 2 soluble.

sTIM-3: Inmunoglobulina de células T y dominio de mucina 3 soluble.

sTNF α : Factor de necrosis tumoral α soluble.

SLP: Supervivencia libre de progresión.

SLR: Supervivencia libre de recaída.

SPSS: *Statistical Package for the Social Sciences.*

TC-TAP: Tomografiacomputarizada toraco-abdomino-pélvica.

TILs: Linfocitos infiltrantes de tumor.

TIMP1: Inhibidor tisular de las metaloproteinasas 1.

TGF: Factor de crecimiento transformador.

TNF: Factores de necrosis tumoral.

TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa

Treg: Células T reguladoras.

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular.

VEGFR-1: Factor de crecimiento endotelial vascular 1.

vs: Versus.

yRCp: Respuesta completa patológica tras neoadyuvancia.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los grados histológicos tumorales.

Tabla 2. Características de los distintos subtipos de cáncer de mama.

Tabla 3. Comparación de esquemas y tasas de RCp entre los ensayos con inmunoterapia neoadyuvante en el CMTN.

Tabla 4. Valoración de la respuesta patológica local según el sistema de Miller y Payne.

Tabla 5. Valoración de la respuesta patológica ganglionar según el sistema de Miller y Payne.

Tabla 6. Características de los anticuerpos empleados para la tinción IHQ de los distintos marcadores en tejido tumoral.

Tabla 7. Panel preconfigurado de 22 citoquinas que utiliza la tecnología Luminex xMAP, kit HSTCMAG-28SK.

Tabla 8. Panel preconfigurado de 17 analitos reguladores del sistema inmune que utiliza la tecnología Luminex xMAP, Kit HCKP1-11K y HCCBP3MAG-1K.

Tabla 9. Características clínico-patológicas basales de las pacientes del estudio.

Tabla 10. Diversos esquemas de QTN empleados en la cohorte de pacientes con CMTN.

Tabla 11. Características anatomo-patológicas basales de las pacientes del estudio.

Tabla 12. Expresión media y rango de los TILs, así como las proporciones en la distribución de los TILs peri/intratumorales y CD4+/CD8+ de las pacientes con CMTN precoz.

Tabla 13. Descripción de la media, la mediana y los valores mínimos y máximos de los niveles plasmáticos basales de las citoquinas analizadas.

Tabla 14. Descripción de la media, la mediana y los valores mínimos y máximos de los niveles plasmáticos basales de los puntos de control inmunológicos solubles analizados.

Tabla 15. Características de la intervención quirúrgica de las pacientes del estudio.

Tabla 16. Características post-quirúrgicas de las pacientes del estudio.

Tabla 17. Tipo de respuestas patológicas a quimioterapia en función de los niveles plasmáticos de sGM-CSF.

Tabla 18. Tipo de respuestas patológicas a quimioterapia en función de los niveles plasmáticos de sCD86.

Tabla 19. Tipo de respuestas patológicas a nivel ganglionar a quimioterapia en función de los niveles plasmáticos de sGal-3.

Tabla 20. Tipo de respuestas patológicas a nivel ganglionar a quimioterapia en función de los niveles plasmáticos de sITAC.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tumores más frecuentemente diagnosticados en el mundo. Estimación para el año 2020, ambos sexos.

Figura 2. Mecanismos de carcinogénesis modificados de Hanahan, 2022.

Figura 3. Porcentajes de cáncer de mama según el patrón de herencia.

Figura 4. Distribución de tipos histológicos de cáncer de mama.

Figura 5. Tamaños del tumor primario T1-2-3.

Figura 6. Clasificación del tumor primario T4.

Figura 7. Clasificación de N en función de la afectación ganglionar.

Figura 8. Ejemplo de clasificación de subtipos cáncer de mama usando PAM50.

Figura 9. Características y distribución de los subtipos de cáncer de mama triple negativo (CMTN) según la primera clasificación de Lehmann.

Figura 10. Mecanismos de acción de los principales agentes quimioterápicos en cáncer de mama triple negativo (CMTN).

Figura 12. Imagen del microambiente tumoral y células que componen este microambiente heterogéneo.

Figura 13. Dibujo esquematizado del microentorno tumoral e interacciones celulares.

Figura 14. Representación del orden en la obtención de las muestras.

Figura 15. Diagrama de ejecución.

Figura 16. Número de pacientes de la cohorte de cáncer de mama triple negativo (CMTN) incluidas en cada uno de los estadios pronósticos según la 8ª edición de la AJCC.

Figura 17. Imágenes a 200 aumentos de la tinción con hematoxilina-eosina donde se observa un tumor mamario bien diferenciado vs. uno pobremente diferenciado (derecha).

Figura 18. Imagen a 40 aumentos donde se aprecia un elevado patrón de tinción nuclear del antígeno Ki-67 mediante IHQ.

Figura 19. Comparativa de imágenes a 200 aumentos donde se observa el patrón de tinción de membrana de HER2 mediante IHQ.

Figura 20. Imagen en 200 aumentos del patrón de tinción citoplasmático y de membrana de EGFR mediante IHQ.

Figura 21. Imagen a 40 aumentos de la positividad de la tinción nuclear del receptor de andrógenos por IHQ en tejido tumoral.

Figura 22. Imagen a 40 aumentos (izquierda) y 200 aumentos (derecha) donde se observa un elevado patrón de infiltración linfocitaria tumoral (superior al 30%).

Figura 23. Representación de la mediana de cifras plasmáticas medidas en pg/ml de las diversas citoquinas analizadas.

Figura 24. Representación de la mediana de cifras plasmáticas medidas en pg/ml de los puntos de control inmunológicos analizados.

Figura 25. Porcentajes de los diferentes tipos de intervenciones quirúrgicas realizadas.

Figura 26. Tipo de respuestas patológicas a quimioterapia neoadyuvante (QTN).

Figura 27. Gráfica de los niveles plasmáticos de sGal-3, sMIP-3 α e sIL-8 en función del tamaño tumoral (inferior a 5 cm vs. superior a 5cm).

Figura 28. Gráfica de los niveles plasmáticos de sMIP-1 α , sPD-1, sLAG-3, sTIM-3 y sBTLA en función del tamaño tumoral (inferior a 2 cm vs. superior a 2cm).

Figura 29. Gráfica de los niveles plasmáticos de sTNF α y sGal-3 en función de la afectación ganglionar.

Figura 30. Gráfica de los niveles de sITAC en función de tumores localizados vs. localmente avanzados.

Figura 31. Gráfica de los niveles de Gal-3 e IL-8 en función del estadio tumoral.

Figura 32. Gráfica de los niveles de sPD-1, sCTLA-4, sCD80/B7-1, sTIM-3, sBTLA, sTLR-2, sICOS, sCD27, sCD28 y sGITRL en función de tumores localizados vs. localmente avanzados.

Figura 33. Gráfica de los niveles de sTNF α e sIL-2 según el estado mutacional de BRCA1/2.

Figura 34. Gráfica de los cifras de sPD-L2 en función del grado histológico (G1-2 vs. G3).

Figura 35. Gráfica de los niveles de sGM-CSF, sIL-1 β e sIL-23 según la expresión de Ki-67 (<50% vs. \geq 50%).

Figura 36. Gráfica de la expresión de sPD-L2 y sTIM-3 según la expresión de HER2 (0 vs. low).

Figura 37. Gráfica de los niveles de sIL-7 según la expresión de EGFR (negativo vs. positivo).

Figura 38. Gráfica de las cifras de sIL-6 en función de la expresión de TILs (<30% vs. \geq 30%).

Figura 39. Curva de Kaplan-Meier para supervivencia libre de recaída y supervivencia global en función del tamaño tumoral (tumores < 2 cm vs tumores \geq 2cm).

Figura 40. Curva de Kaplan-Meier para supervivencia libre de recaída y supervivencia global en función de la afectación ganglionar.

Figura 41. Curva de Kaplan-Meier para supervivencia libre de recaída y supervivencia global en función de la afectación ganglionar (N0,N1,N2,N3).

Figura 42. Curva de Kaplan-Meier para supervivencia libre de recaída y supervivencia global en función del estadio clínico (E-I y II vs E-III).

Figura 43. Curva de Kaplan-Meier para supervivencia libre de recaída y supervivencia global en función del estadio clínico (E-IB,E-IIA,E-IIB,E-IIIB,E-IIIC).

Figura 44. Curva de Kaplan-Meier para supervivencia libre de recaída y supervivencia global según el tipo de respuesta patológica (RCp vs. no RCp).

Figura 45. Curva de Kaplan-Meier para supervivencia libre de recaída y supervivencia global en función del grado histológico (G1-2 vs. G3).

Figura 46. Curva de Kaplan-Meier para supervivencia libre de recaída según la expresión de TILs ($\geq 30\%$ vs. $< 30\%$).

Figura 47. Curva de Kaplan-Meier para supervivencia global en función de los niveles de sTNF α .

Figura 48. Curva de Kaplan-Meier para supervivencia libre de recaída y supervivencia global en función de los niveles de sGal-3.

Figura 49. Curva de Kaplan-Meier para supervivencia libre de recaída y supervivencia global según los niveles de sMIP-3 α .

Figura 50. Curva de Kaplan-Meier para supervivencia global en función de los niveles de sIL-5.

Figura 51. Curva de Kaplan-Meier para supervivencia global en función de los niveles de sIL-8.

Figura 52. Curva de Kaplan-Meier para supervivencia libre de recaída y supervivencia global en función de los niveles de sIL-10.

Figura 53. Curva de Kaplan-Meier para supervivencia libre de recaída y supervivencia global en función de los niveles de sIL-13.

Figura 54. Curva de Kaplan-Meier para supervivencia global según los niveles de sIL-17A.

Figura 55. Curva de Kaplan-Meier para supervivencia libre de recaída y supervivencia global en función de los niveles de sTIM-3.

Figura 56. Resumen de los diversos marcadores tanto a nivel clínico, como tisular y plasmático, con su valor predictivo de respuesta a quimioterapia neoadyuvante (QTN) y valor pronóstico en la cohorte de pacientes de cáncer de mama triple negativo (CMTN) precoz.

ÍNDICE GENERAL

1	INTRODUCCIÓN.....	25
1.1	GENERALIDADES DEL CÁNCER DE MAMA	27
1.1.1	Epidemiología.....	27
1.1.2	Carcinogénesis mamaria	28
1.1.3	Etiología	30
1.1.4	Factores de riesgo	32
1.1.5	Síntomas y signos	32
1.1.6	Diagnóstico.....	33
1.1.7	Subtipos histológicos	34
1.1.8	Clasificación histopatológica del cáncer de mama	36
1.1.9	Estadificación	39
1.2	CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO.....	41
1.2.1	Características generales del cáncer de mama triple negativo.....	41
1.2.2	Clasificación molecular del cáncer de mama triple negativo	42
1.2.3	Tratamiento sistémico del cáncer de mama triple negativo con enfermedad local o localmente avanzada.....	45
1.2.4	Valoración de la respuesta patológica a la quimioterapia neoadyuvante en cáncer de mama triple negativo	50
1.3	INMUNOREGULACIÓN Y BIOMARCADORES INMUNES EN CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO.....	52
1.3.1	Biomarcadores inmunes en tejido tumoral en cáncer de mama triple negativo...53	
1.3.2	Mediadores inmunes solubles en cáncer de mama triple negativo	61
1.4	BIOPSIA LÍQUIDA EN CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO	64
2	HIPÓTESIS DE TRABAJO	67
3	OBJETIVOS.....	71
3.1	OBJETIVO PRINCIPAL	73
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	73
4	MATERIAL Y MÉTODOS	75
4.1	DISEÑO Y POBLACIÓN DEL ESTUDIO	77
4.1.1	Tipo de estudio	77
4.1.2	Población y muestra del estudio	77
4.2	CRITERIOS DE SELECCIÓN.....	77
4.2.1	Criterios de inclusión del estudio.....	77

4.2.2	Criterios de exclusión del estudio	78
4.2.3	Muestras recolectadas	78
4.3	PROTOCOLO DE EJECUCIÓN	79
4.3.1	Recogida de variables epidemiológicas y clínicas	79
4.3.2	Tratamientos realizados.....	80
4.3.3	Protocolo de seguimiento	82
4.4	METODOLOGÍA DEL ANÁLISIS.....	83
4.4.1	Estudio histopatológico	83
4.4.2	Técnicas analíticas	87
4.4.3	Análisis estadísticos empleados	90
4.5	CONFLICTO DE INTERESES Y COMITÉ DE ÉTICA	91
5	RESULTADOS	93
5.1	DESCRIPCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS BASALES DE LA COHORTE DE PACIENTES CON CMTN.....	95
5.1.1	Características de las variables clínico-patológicas	95
5.1.2	Características de las variables histopatológicas en tejido	97
5.1.3	Características de los mediadores solubles.....	102
5.2	DESCRIPCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS POST-QUIRÚRGICAS DE LA COHORTE DE PACIENTES CON CMTN.....	105
5.3	ANÁLISIS DE CORRELACIÓN ENTRE VARIABLES	109
5.4	ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA (SUPERVIVENCIA LIBRE DE RECAÍDA Y SUPERVIVENCIA GLOBAL)	120
5.4.1	Análisis de supervivencia de las variables clínico-patológicas	120
5.4.2	Análisis de supervivencia de las variables histopatológicas en tejido	124
5.4.3	Análisis de supervivencia de los mediadores solubles	125
6	DISCUSIÓN	133
6.1	DISCUSIÓN DE LAS VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE LA ENFERMEDAD.....	135
6.2	DISCUSIÓN DE LAS VARIABLES HISTOPATOLÓGICAS DE LA ENFERMEDAD.....	138
6.3	DISCUSIÓN DE LOS MEDIADORES SOLUBLES INMUNES.	143
6.3.1	Citoquinas solubles.	143
6.3.2	Puntos de control inmunológico solubles.	148
7	CONCLUSIONES.....	149
8	BIBLIOGRAFÍA.....	149
9	ANEXOS	149

1 INTRODUCCIÓN

1.1 GENERALIDADES DEL CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama (CM) es una proliferación maligna de las células epiteliales que revisten los conductos o lobulillos mamarios. Es una enfermedad clonal por la cual, las células adquieren la capacidad de dividirse sin control ni orden formando una tumoración, producto de una serie de mutaciones somáticas o de línea germinal.

1.1.1 Epidemiología

El CM es una enfermedad que afecta principalmente a las mujeres, representando sólo el 1% en hombres. Actualmente, es la neoplasia maligna más frecuente en la mujer y representa uno de cada cuatro casos de cáncer entre las mujeres, además de ser la principal causa de muerte por cáncer en el género femenino [1].

En 2020, a nivel mundial, se diagnosticaron alrededor de 2,2 millones de mujeres con CM, falleciendo casi 630.000 debido a la enfermedad [2,3]. El número estimado de nuevos diagnósticos de CM en los países de la Unión Europea fue de aproximadamente 405.000 casos, con una incidencia anual ajustada por edad de 145 casos de cada 100.000 y una mortalidad de 32.9 de cada 100.000 personas [4]. Se estima que los cánceres más frecuentemente diagnosticados en España en 2023 teniendo en cuenta ambos sexos serán los tumores colorrectales seguido por las neoplasias de mama [5], siendo este tipo de tumor el más frecuente entre las mujeres en nuestro país (alrededor del 30% de los cánceres diagnosticados en mujeres) [4,6].

La incidencia de CM ha aumentado desde la introducción de las pruebas de cribado con mamografías y continúa creciendo debido al progresivo envejecimiento de la población. Aproximadamente un 25% de los CM se diagnostican en pacientes menores de 50 años y menos del 5% de los casos ocurren en pacientes con una edad inferior a los 35 años.

La prevalencia estimada del CM a 5 años (personas diagnosticadas en los últimos 5 años y vivas, con o sin enfermedad) en Europa fue de 1.814.572 casos en 2012 [4] y 6.875.099 casos en todo el mundo. En España la prevalencia estimada para el año 2020 fue de casi 130.000 casos (figura 1) [3]. La prevalencia del CM está aumentando en los últimos años debido a un aumento de la incidencia y una mejoría en los resultados de los tratamientos que conlleva un aumento de la supervivencia [7,8].

Sin embargo, el CM sigue siendo el tumor más diagnosticado y la principal causa de muerte relacionada con el cáncer en mujeres en el mundo, aunque la mortalidad por cáncer de pulmón en mujeres está superando a la mortalidad por CM en algunos países. En España, se estima que el CM representa la cuarta causa de mortalidad por neoplasia incluyendo ambos sexos, siendo la principal causa de mortalidad por tumores malignos en mujeres [2,3].

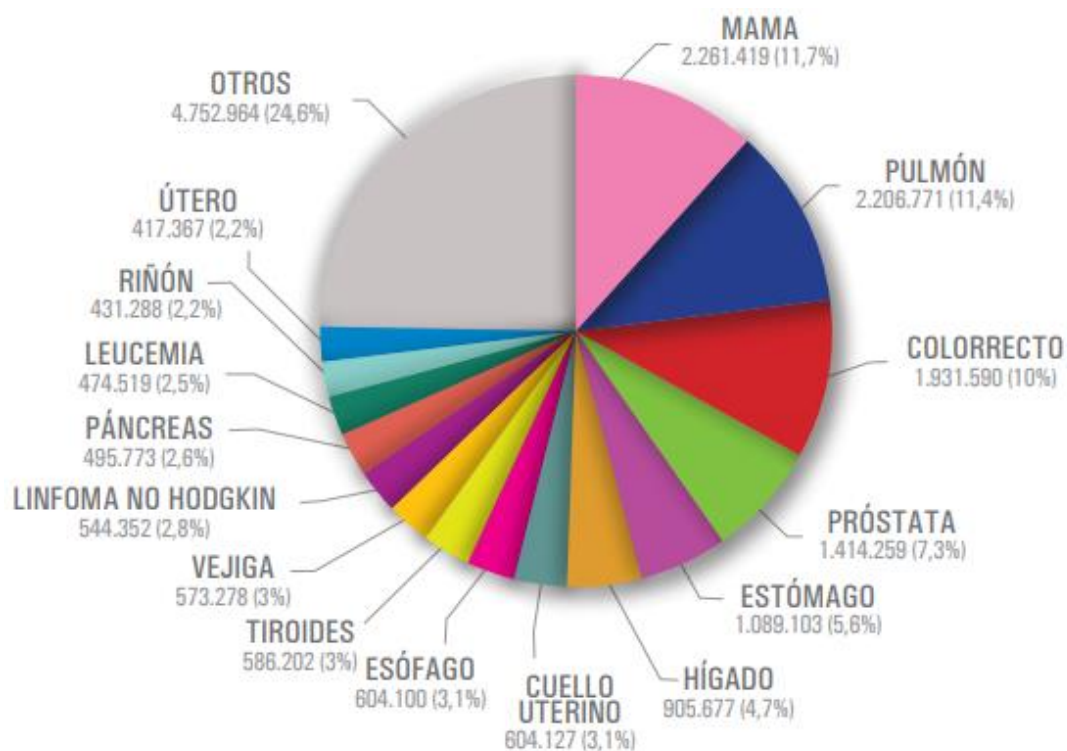


Figura 1. Tumores más frecuentemente diagnosticados en el mundo. Estimación para el año 2020, ambos sexos. Fuente: GLOBOCAN 2020 [1].

1.1.2 Carcinogénesis mamaria

Las características distintivas del cáncer comprenden varias capacidades biológicas adquiridas mediante múltiples pasos en el desarrollo tumoral. Estas características fueron propuestas por Hanahan en el año 2000, ampliadas en 2011 y posteriormente en 2022 (figura 2), para racionalizar las complejidades de la enfermedad neoplásica [9,10].

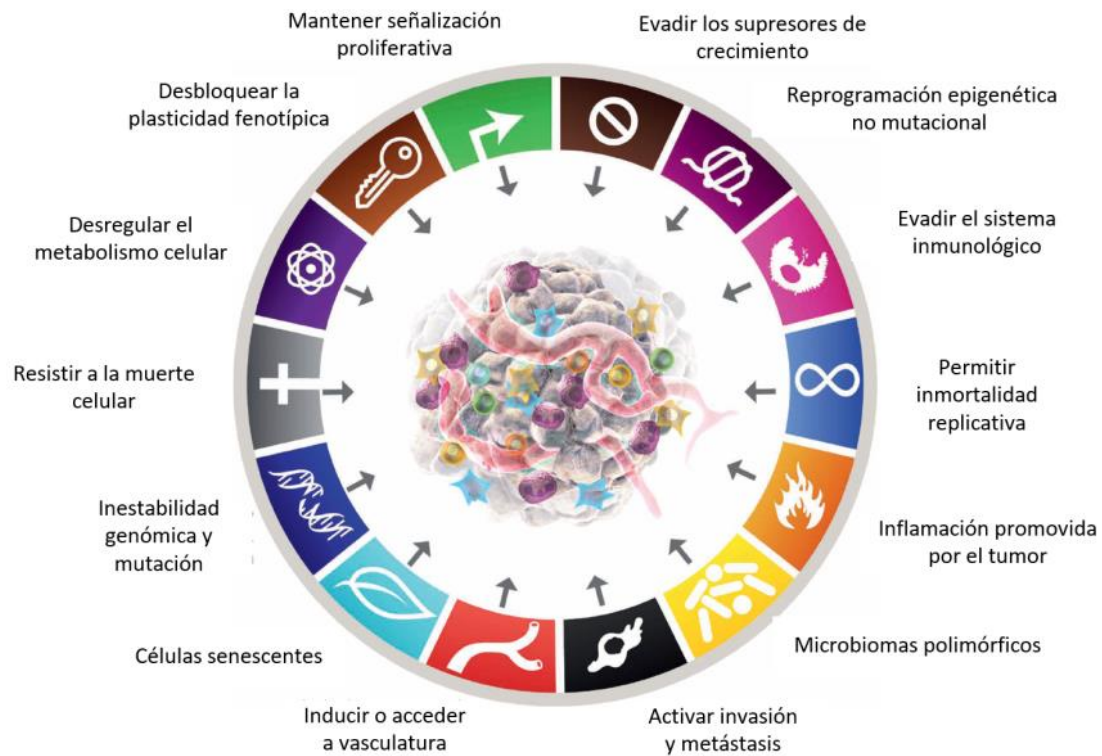


Figura 2. Mecanismos de carcinogénesis modificados de Hanahan, 2022. Fuente: *Hallmarks of Cancer: New Dimensions*. *Cancer Discovery*, Hanahan, 2022, [10].

Mecanismos de carcinogénesis [9,10]:

1. Autosuficiencia en señales de crecimiento [11].
2. Insensibilidad a las señales inhibitorias de la proliferación [12].
3. Evasión de la apoptosis [13].
4. Potencial de proliferación ilimitado [14].
5. Angiogénesis mantenida [15].
6. Invasión de tejidos y metástasis [16].
7. Inestabilidad y mutaciones del genoma.
8. Mantenimiento del tumor causado por la inflamación.
9. Desregulación del metabolismo energético celular.
10. Evasión de la destrucción inmune.
11. Desbloqueo de la plasticidad fenotípica.
12. Reprogramación epigenética no mutacional.
13. Microbioma.
14. Senescencia celular.

1.1.3 Etiología

El CM es una enfermedad compleja, heterogénea y multifactorial, en la que intervienen tanto factores genéticos como no genéticos. Sólo del 5 al 10% del CM es de origen hereditario, aunque el 90% de los casos restantes presentan algún componente genético (figura 3).

Se han descrito diversos genes relacionados con el CM. Los más destacables son *BRCA1* y *BRCA2* (genes de susceptibilidad a cáncer de mama, *BReast CAncer 1/2*). Estos dos genes se asocian particularmente con el CM hereditario, pero existen otros genes como *PALB2*, *Rb*, *p53* y *NF-1* que se pueden encontrar mutados tanto en cánceres de tipo esporádico como hereditario [17].

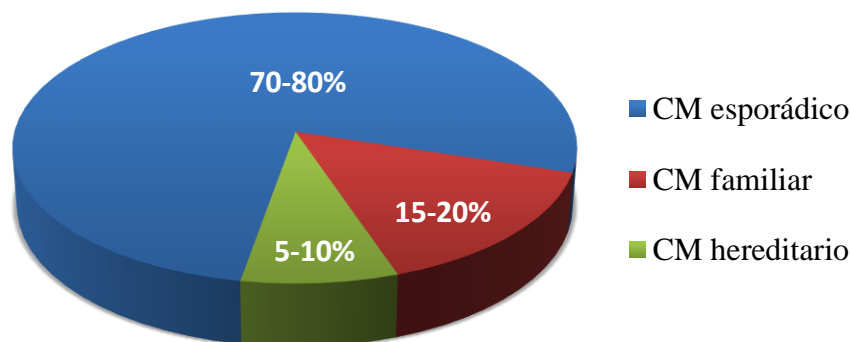


Figura 3. Porcentajes de CM según el patrón de herencia [17]. Figura de elaboración propia.

El **cáncer de mama esporádico** representa entre el 70 al 80% de los casos de CM (figura 3) y se asocia a distintas alteraciones genéticas somáticas, es decir, que no afectan a las células germinales. Los tumores esporádicos se asocian a mutaciones (errores puntuales en los aminoácidos que configuran los genes), deleciones (eliminación de una región del gen) y amplificaciones (varias copias de un mismo gen) de distintos genes. Aunque no se han identificado todos los genes o mutaciones relacionadas con este tipo de cáncer, se han encontrado algunas regiones cromosómicas comunes en el CM, algunas de las cuales corresponden a genes mutados y otros desregulados. Se trata de diversos genes con funciones muy distintas como factores de crecimiento, moléculas que actúan como señales intracelulares, reguladores del ciclo celular y moléculas de adhesión.

El **cáncer de mama familiar** constituye del 15 al 20% del CM (figura 3). Normalmente, afecta a personas con antecedentes familiares de CM (dos o más familiares de primer o segundo grado con CM), pero no atribuibles a la mutación de un solo gen, sino por contribución de muchos genes (herencia poligénica o multifactorial). No existe un patrón de herencia definido, pero sí un agrupamiento de casos esporádicos. Estas familias se consideran de un riesgo moderado, más elevado que el de la población general.

El **cáncer de mama hereditario** representa entre el 5 al 10% de los cánceres mamarios (figura 3). Normalmente, son el resultado de la herencia autosómica dominante (HAD) de un gen mutado. La edad de aparición de CM hereditario es considerablemente inferior a la de los casos esporádicos. La prevalencia de CM bilateral es más alta y pueden estar asociados con la aparición de otros tumores [18].

Las primeras evidencias de que existía un gen dominante con susceptibilidad al CM surgieron en 1984 mediante un modelo estadístico utilizado por Williams y Anderson a partir del estudio de 200 familias [19]. Este primer estudio, junto a otros posteriores, puso en evidencia que las mutaciones en el gen *BRCA1* daban lugar a susceptibilidad para desarrollar CM y cáncer de ovario. Posteriormente, se localizó otro gen relacionado con esta susceptibilidad que se identificó como *BRCA2* [17,20].

Estudios recientes atribuyen entre el 50 y el 70% de los casos de CM hereditario a los genes *BRCA 1* y *2* [21].

- ***BRCA1***: Este gen se halla ubicado en el brazo largo del cromosoma 17 (*17q21*) y codifica para una proteína encargada de regular el proceso de reparación del ADN. La proteína *BRCA1* interviene en las fases S y G2 del ciclo celular. Cuando se produce un daño en el ADN, la proteína *BRCA1* se hiperfosforila y se relocaliza en los sitios de síntesis de ADN, formando un complejo con otras proteínas como la *BRCA2* y la *Rad51*, encargadas de la reparación del daño al ADN asociado a la replicación. Se ha observado que *BRCA1* es inducido por estrógenos. La inhibición de este gen causa un aumento de la proliferación de células del epitelio mamario. Se han descrito alrededor de 600 mutaciones distintas y más del 75% dan origen a una proteína truncada, incrementando el riesgo del desarrollo del CM, de ovario, de próstata y de colon [17,22].

- **BRCA2:** Este gen se halla ubicado en el brazo largo del cromosoma 13 (*13q12-13*). Al igual que *BRCA1*, el producto génico de *BRCA2* está involucrado en el proceso de reparación del ADN, formando un complejo multiproteico con otras proteínas como la *Rad 51*, *BARD1* y *BRCA1*. Por otro lado, parece que existe una relación sinérgica de *BRCA2* con el gen *TP53*. El gen *TP53*, al igual que *BRCA1* y *BRCA2*, es un gen supresor de tumores, pero, a diferencia de *BRCA1/2*, se encuentra mutado en aproximadamente la mitad de los casos de cáncer en general. Se han descrito unas 450 mutaciones de *BRCA2*, muchas de las cuales se asocian al incremento de riesgo para el desarrollo de diversos cánceres, como el cáncer de ovario, de próstata, de páncreas y de laringe [17,23].

A parte de *BRCA1/2* también se han identificado otros genes de predisposición a CM hereditario mucho menos frecuentes, entre los que destacan *ATM*, *TP53*, *PTEN*, *CHEK2*, *CDH1* o *PALB2* [24].

1.1.4 Factores de riesgo

Aparte de la predisposición genética heredable, existen otros factores tanto modificables como no modificables que pueden acelerar el desarrollo o ser la causa inicial del CM [25].

Dentro de los **factores extrínsecos o modificables** [25] se encuentran la nuliparidad, la edad superior a 30 años en el primer embarazo, no dar lactancia materna, los altos niveles de hormonas sexuales endógenas en la menopausia, las hormonas exógenas (uso de anticonceptivos orales y la terapia hormonal sustitutiva), el consumo de alcohol, el tabaquismo, la obesidad, el sedentarismo y una dieta rica en carne y grasas [26].

Dentro de los **factores intrínsecos o no modificables** se hallan [25] la edad, la historia menstrual larga, la patología benigna de la mama, la exposición a radiación ionizante y la densidad mamográfica.

1.1.5 Síntomas y signos

A pesar de que en numerosas ocasiones el CM localizado es asintomático, puede debutar como nódulo mamario de palpación pétreo, cambios en la piel de la zona mamaria como la aparición de ulceraciones, retracción de la piel o enrojecimiento, cambios en la forma o el tamaño de alguna de las mamas o del pezón, secreción sero-

hemática a través del pezón, nódulo axilar palpable o la fijación del tejido de la mama en el tórax. En fases más avanzadas de la enfermedad, otros síntomas como la astenia o el dolor óseo pueden indicar la presencia de metástasis a distancia [27].

1.1.6 Diagnóstico

El diagnóstico del CM se basa en la combinación del examen clínico junto con pruebas de imagen y precisa ser confirmado por biopsia.

El examen clínico incluye la palpación bimanual de ambas mamas y los ganglios linfáticos regionales, así como una exploración física completa.

Las técnicas de imagen utilizadas en el diagnóstico de CM incluyen la mamografía bilateral y ecografía de ambas mamas y ganglios linfáticos regionales [28]. No es preciso la realización de una resonancia magnética mamaria de forma rutinaria, pero debe considerarse pacientes portadoras de mutaciones *BRCA1/2*, en el subtipo de cáncer lobulillar, en las mamas densas, si se sospecha multifocalidad, en el caso de implantes mamarios y cuando existan discrepancias entre las imágenes convencionales y el examen clínico o los hallazgos de la imagen ecográfica no son concluyentes [2].

El cribado para CM en España se realiza mediante mamografía cada dos años en las mujeres de los 50 a los 69 años, aunque en algunas regiones el cribado comienza a los 45 años y se prolonga hasta los 75 años. Se están probando varias técnicas nuevas para el cribado y el diagnóstico por imagen, como la mamografía y la ecografía tridimensionales [29–31].

Pueden realizarse exámenes adicionales como una tomografía computerizada toraco-abdomino-pélvica (TC-TAP), la gammagrafía ósea o una tomografía por emisión de positrones – tomografía computada (PET-TC) con el objetivo de excluir una posible extensión de la enfermedad.

Además de las técnicas de imagen, la evaluación de la enfermedad previa al tratamiento incluye el examen histopatológico del tumor primario y la histología de los ganglios axilares, si se sospecha afectación de los mismos.

El diagnóstico patológico debe basarse en una biopsia con aguja gruesa (BAG), preferiblemente obtenida mediante ultrasonidos. Si se planifica un tratamiento neoadyuvante, una biopsia mediante BAG es obligatoria para garantizar un diagnóstico

de enfermedad neoplásica y poder realizar la evaluación de biomarcadores. En el caso de tumores multifocales y multicéntricos, se deben intentar biopsiar todas las lesiones. Está recomendada la colocación de un marcador (por ejemplo, un clip quirúrgico), en la zona tumoral en el momento de realizar la biopsia, para asegurar así la resección quirúrgica en el lugar adecuado tras un tratamiento sistémico. Además, es necesaria una punción-aspiración con aguja fina (PAAF) guiada por ultrasonidos o una BAG de las adenopatías sospechosas. No se recomienda una biopsia por escisión del ganglio linfático excepto en casos de varias biopsias negativas con una alta sospecha de afectación tumoral adenopática [28].

También puede ser útil la utilización de marcadores tumorales como el CA 15-3 (Antígeno Carbohidratado 15-3). El CA 15-3 es un carbohidrato asociado a tumor que se desprende de las células tumorales y puede ser detectado en la circulación periférica. El CM es el tipo de cáncer que más libera CA 15-3, sobre todo en enfermedad avanzada y es utilizado rutinariamente en el seguimiento de la enfermedad neoplásica. La sensibilidad de los marcadores tumorales para la detección de CM oscila entre el 25-30% en los tumores locorregionales y entre el 70-85 % en los tumores metastásicos. La determinación basal de CA 15-3 en mujeres diagnosticadas de CM es un factor pronóstico de supervivencia libre de progresión, incluso en mujeres sin enfermedad diseminada [32].

1.1.7 Subtipos histológicos

Dentro de la clasificación desde el punto de vista histopatológico se puede dividir al CM en dos grandes grupos: los carcinomas in situ y los carcinomas infiltrantes. El término carcinoma in situ, se refiere al tipo de cáncer que se encuentra confinado en la luz de los ductos o de los lobulillos glandulares sin invadir los tejidos vecinos y representan sobre el 20% de todos los diagnósticos de CM. Por su parte, el carcinoma infiltrante, prolifera hasta romper la llamada membrana basal e invadir los tejidos que rodean a los ductos y lobulillos mamarios. El carcinoma infiltrante representa aproximadamente el 80% de los diagnósticos de CM [33,34].

Los carcinomas mamarios son un grupo de tumores derivados de las células epiteliales del parénquima mamario, particularmente de las células de la unidad terminal ducto-lobular. La clasificación más ampliamente utilizada para esta patología es la de la Organización Mundial de la Salud (OMS) presentándose en orden de frecuencia el

Introducción

carcinoma ductal (70-80%), lobulillar (5-15%), mucinoso (3-5%), medular (2-5%), tubular (1-4%), papilar (1%) y metaplásico (<1%) [35] (figura 4).

El carcinoma ductal infiltrante (CDI) corresponde al tipo histológico más común y su diagnóstico se realiza principalmente por descarte, ya que no corresponde a ninguna de las categorías anteriores o no es especificado como otra forma de CM infiltrante.

El carcinoma lobulillar infiltrante (CLI) es el siguiente tipo de CM en frecuencia. Estos tumores tienden a ser multicéntricos, y también pueden ser bilaterales en el 35-60% de los casos; siendo el riesgo de desarrollar un carcinoma contralateral unas 10 veces mayor en las mujeres premenopáusicas.

Un tumor maligno de lento crecimiento y menos agresivo que el CDI, es el carcinoma medular que está compuesto de estroma fibroso, cordones y masas de células grandes bien circunscritas [35,36].

Otro subtipo de CM es el carcinoma tubular, que se caracteriza por ser un tumor bien diferenciado, con escaso potencial metastásico debido a su patrón de crecimiento no agresivo y posee un excelente pronóstico. Se presenta en edades más tardías y la afectación ganglionar ocurre en aproximadamente el 10 % de los casos.

El carcinoma mucinoso o coloide es un tipo de neoplasia que se suele presentar en mujeres de edad avanzada. Este tumor se caracteriza por su lento crecimiento y baja incidencia de infiltración a ganglios axilares, asociándose con un pronóstico favorable.

El carcinoma papilar corresponde a un grupo raro y predominante no invasivo de CM, con una baja incidencia de lesiones a distancia. La incidencia de este tipo de tumor es mayor en mujeres posmenopáusicas.

El carcinoma metaplásico de mama es un tipo de CM infrecuente que suele diagnosticarse en pacientes de edad avanzada, con unas características anatomopatológicas mixtas asociando un componente epitelial/ductal con un componente conectivo/mesenquimal malignos. Este tipo de neoplasia con frecuencia se relaciona con los tumores triple negativos [35,37,38].

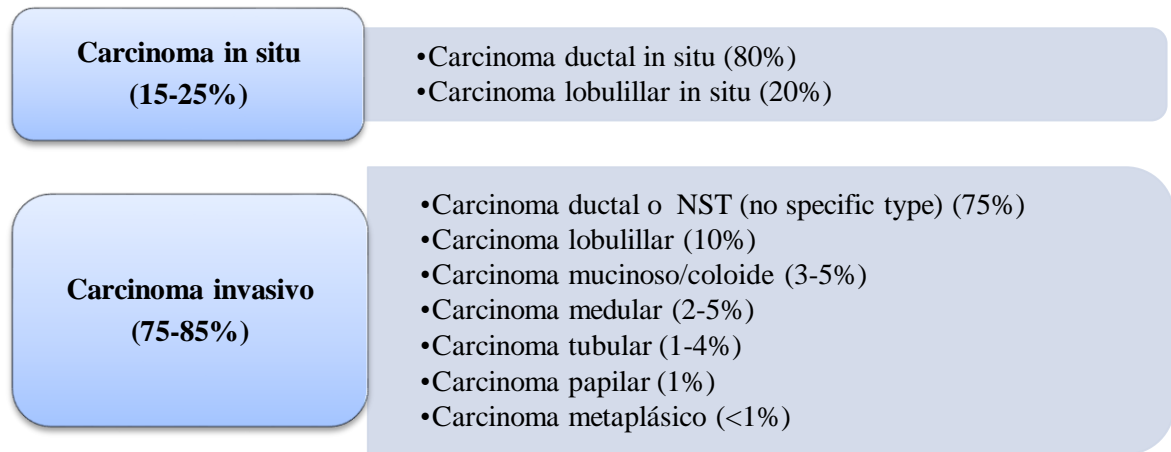


Figura 4. Distribución de tipos histológicos de cáncer de mama [35].

1.1.8 Clasificación histopatológica del cáncer de mama

El diagnóstico patológico se realiza de acuerdo con la Clasificación de la OMS (Organización Mundial de la Salud) [39].

El informe patológico debe incluir el tipo histológico, el tamaño tumoral, el grado de diferenciación tumoral, la infiltración linfovascular y perineural, la presencia o ausencia de carcinoma in situ, la evaluación de los márgenes quirúrgicos, la afectación ganglionar, el índice de proliferación celular o Ki-67 (antígeno KI-67), la determinación por inmunohistoquímica (IHQ) del estado de receptor de estrógenos (RE), y para el cáncer infiltrante también se debe incluir la evaluación de receptor de progesterona (RPg) y expresión o amplificación del gen *HER2* (receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano) [40].

El gen *HER2* codifica la proteína transmembrana HER2. Una sobreexpresión o amplificación de *HER2* provoca un crecimiento celular descontrolado. El estado de amplificación de *HER2* puede determinarse a través de IHQ o a partir de la hibridación in situ cuando se presentan tumores con expresión ambigua de HER2 en la IHQ [40]. Se define HER2 como positivo cuando más del 10% de las células neoplásicas presentan una tinción intensa y uniforme de la membrana mediante técnicas de IHQ, y por FISH (análisis por hibridación fluorescente in situ) si el número de copias del gen *HER2* es 4 o mayor [2,41].

El grado tumoral se refiere a la descripción microscópica de las células tumorales. En general, se asigna un grado de 1 a 3, dependiendo de su mayor o menor semejanza con las células normales. Así, en los tumores de grado 1, la organización del tejido del tumor y las células tumorales poseen una apariencia cercana a la normal, y tienden a crecer y a diseminarse más lentamente. Por el contrario, las células y el tejido de los tumores de grado 2 y 3 se diferencian bastante de las células y los tejidos normales y tienden a crecer y a diseminarse con mayor rapidez (tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de los grados histológicos tumorales [2].

Grado tumoral	Descripción
Grado indeterminado (Gx)	No es posible asignar un grado.
Grado 1 (G1)	Tumor bien diferenciado, de grado bajo y de crecimiento y diseminación lenta.
Grado 2 (G2)	Moderadamente diferenciado (grado intermedio).
Grado 3 (G3)	Tumor pobremente diferenciado, de grado alto y normalmente de crecimiento y diseminación más rápidos que los anteriores.

El marcador de proliferación celular medido a través del índice Ki-67, proporciona información útil y es preciso para la clasificación de los tumores hormonales o luminales [42,43].

Para el pronóstico y la decisión terapéutica, los tumores se agrupan en subgrupos intrínsecos que vienen definidos por la histología y los datos de IHQ (tabla 2) [2,44,45]. Actualmente, la clasificación incluye el perfil luminal A y B, HER 2 y triple negativo.

Tabla 2. Características de los distintos subtipos de cáncer de mama [2].

SUBTIPOS DE CM	CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS
Luminal A	“Luminal A-like” RE positivo RPg con alta expresión (habitualmente >20%) HER2 negativo Baja expresión de Ki67 (<15-20%) Firma génica de bajo riesgo
Luminal B	“Luminal B-like (HER2 negativo)” RE positivo HER2 negativo RPg con baja expresión (habitualmente <20%) o alta expresión de Ki67 (depende del laboratorio, normalmente >15-20%) o firma génica de alto riesgo “Luminal B-like (HER2 positivo)” RE positivo HER2 positivo Cualquier expresión de Ki67 o de RPg
HER 2	“HER2 positivo (no luminal)” Ausencia de expresión de RE y RPg HER2 positivo Cualquier expresión de Ki67
Basal-like	“Triple negativo” Ausencia de expresión de RE y RPg HER2 negativo Cualquier expresión de Ki67

Además, se recomienda añadir en el informe histopatológico el porcentaje de linfocitos infiltrantes de tumor (TILs, por sus siglas en inglés) ya que se ha observado que tiene un valor pronóstico y predictivo de respuesta al tratamiento sistémico en el CM *HER2* positivo y triple negativo [46–48]. Su uso como factor pronóstico está avalado por el Consenso de *St. Gallen* de 2019, pero actualmente la expresión de TILs no se utiliza para la toma de decisiones terapéuticas, ni para escalar o desescalar el tratamiento [2].

El consejo genético y la realización de mutaciones en línea germinal como *BRCA1/2* y otras mutaciones frecuentes deberían de realizarse en los pacientes de alto riesgo de padecer un cáncer hereditario y en el subtipo de cáncer de mama triple negativo (CMTN) [29].

1.1.9 Estadificación

Actualmente, la estadificación del CM se basa según los criterios de la 8ª edición del *American Joint Committee on Cancer* (AJCC). Este método de estadificación, aparte de la información puramente anatómica la cual nos proporciona el sistema TNM (tumor – ganglios – metástasis); incluye también información pronóstica relacionada con la biología tumoral como el grado tumoral, el RE, el RPg y la amplificación o sobreexpresión de HER2, así como datos de expresión genómica si están disponibles [49]. Las plataformas genómicas para el CM son unas pruebas que se realizan sobre la muestra tumoral y en las que se analiza la expresión de un grupo de genes, permitiendo caracterizar de forma más precisa el tumor, su biología y su riesgo de recidiva. Las principales plataformas son: *Oncotype* (21 genes), *Mammaprint* (70 genes), *Prosigna* (50 genes) y *Endopredict* (12 genes) [50], con un amplio uso en tumores luminales.

La **T** se refiere al tamaño del tumor o a la infiltración local del mismo. Se describe con números adicionales del 0 (T1,T2,T3) (figura 5) al 4 (T4) (figura 6).

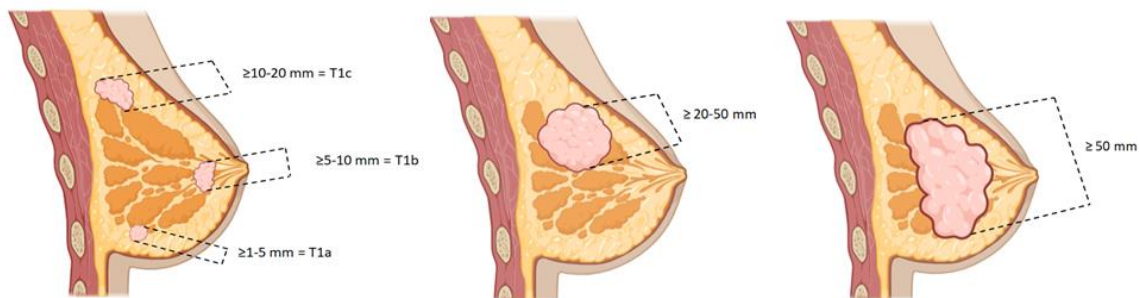


Figura 5. Tamaños del tumor primario T1: T1a de 1 hasta 5 mm, T1b de 5 hasta 10 mm y T1c de 10 hasta 20 mm. T2: desde 20 a 50 mm. T3: a partir de 50 mm [49]. Imágenes de elaboración propia.

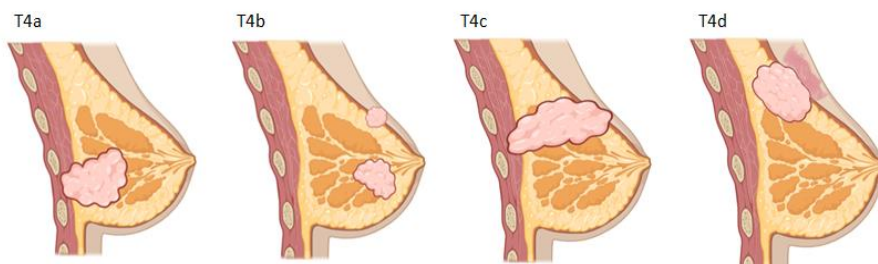


Figura 6. Clasificación del tumor primario T4. T4a: el tumor afecta a la pared torácica. T4b: el tumor afecta a la piel. T4c: afecta tanto a la pared torácica como a la piel. T4d: cáncer inflamatorio [49]. Imágenes de elaboración propia.

Introducción

La **N** describe la afectación de los ganglios linfáticos. Se numera del 0 (N0 si no hay afectación ganglionar) al 3 (N1,N2,N3) (figura 7).

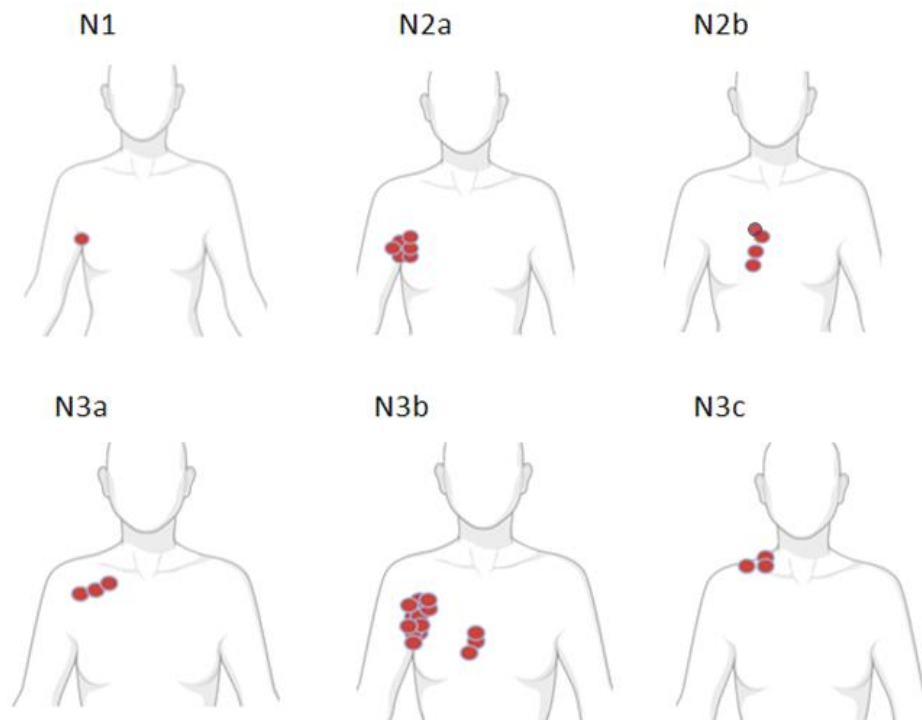


Figura 7. Clasificación de N en función de la afectación ganglionar. N1: entre 1 a 3 adenopatías axilares o de la cadena mamaria interna. N2a: de 4 a 9 adenopatías axilares. N2b: afectación adenopática en cadena mamaria interna que sean clínica o radiológicamente visibles. N3a: 10 o más adenopatías axilares o afectación infraclavicular. N3b: 10 o más adenopatías axilares y en área mamaria interna. N3c: adenopatías supraclaviculares [49].

Imágenes de elaboración propia.

La **M** hace referencia a la afectación o no de otros órganos a distancia. Se numera 0, en ausencia de metástasis, o 1, si hay presencia de enfermedad a distancia.

Los pacientes que presentan un mayor grado de diferenciación tumoral, sobreexpresión de HER2 o triple negativos otorgan un peor estadio pronóstico.

Se pueden clasificar como cáncer localizado, de los estadios IA a IIA; y como localmente avanzado, de los estadios IIB a IIIC. La enfermedad avanzada o metastásica se corresponde con el estadio IV [49].

1.2 CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO

1.2.1 Características generales del cáncer de mama triple negativo

El CMTN representa alrededor del 15% de todos los CM. El CMTN se define de forma estándar mediante técnicas de IHQ en la que los tumores presentan $\leq 1\%$ de expresión de estrógeno y progesterona, y ausencia de sobreexpresión o amplificación de *HER2* de acuerdo con la Sociedad Americana de Oncología Clínica y el Colegio de Patólogos Americanos (ASCO/CAP) [51]. Además, suelen tener un alto grado histológico, elevado índice de proliferación y abundante tejido necrótico.

Este tipo de cáncer tiende a ser más común en mujeres menores de 40 años y de raza afroamericana o latina. Se asocia con mayor frecuencia a mutaciones en *BRCA1/2* (en torno al 15-20%). Se estima que aproximadamente el 70% de los CM que surgen en portadoras de la mutación *BRCA1* y hasta el 25% de las portadoras de *BRCA2* son CMTN. Actualmente, no se han encontrado diferencias pronósticas entre las pacientes portadoras comparadas con las no portadoras de la mutación en *BRCA1/2* [52]. Se recomienda testar el gen *BRCA1/2* en línea germinal a todas las pacientes menores de 60 años con diagnóstico de CMTN según la última actualización de las guías NCCN [53].

La conducta biológica del CMTN suele ser más agresiva y presentan un mayor número de metástasis a distancia, comparada con los otros subtipos de CM. Tienen una mayor tendencia a desarrollar metástasis viscerales, especialmente a pulmón, sistema nervioso central y en menor medida a hígado y hueso. Asimismo, tiene un curso clínico más agresivo, con recurrencias tempranas (normalmente entre 2 y 3 años desde el diagnóstico) y con mayor riesgo de muerte respecto a los tumores hormono-dependientes [54,55].

El CMTN posee un peor pronóstico sobre todo por la falta de tratamientos diana y porque a pesar de las altas tasas de respuesta a la QT, estas respuestas no son prolongadas en el tiempo debido a los mecanismos de resistencia que se desarrollan de forma precoz. La tasa relativa de supervivencia a 5 años del CMTN localizado es del 91%, del 65% en el localmente avanzado y del 11% en estadios metastásicos [56]. La supervivencia en caso de recaída metastásica es mucho menor que en los otros tipos de CM, en torno a 12-18 meses, frente a los 5 años del CM luminal y *HER2*-positivo. Esto pone de manifiesto la importancia de optimizar los tratamientos de la enfermedad

localizada, para reducir al máximo las recaídas y en consecuencia lograr un aumento de la supervivencia.

1.2.2 Clasificación molecular del cáncer de mama triple negativo

El fenotipo triple negativo reúne a un grupo de enfermedades con conductas biológicas diferentes, de epidemiología no claramente precisada pero que comparten un abordaje diagnóstico y terapéutico similar. Desde una perspectiva netamente histológica, el CMTN consiste en una colección de subtipos con distinta biología (figura 8). Con el desarrollo de la secuenciación de alto rendimiento se intenta caracterizar mejor los tipos de CMTN basándose en su perfil mutacional somático para encontrar posibles dianas terapéuticas [57].

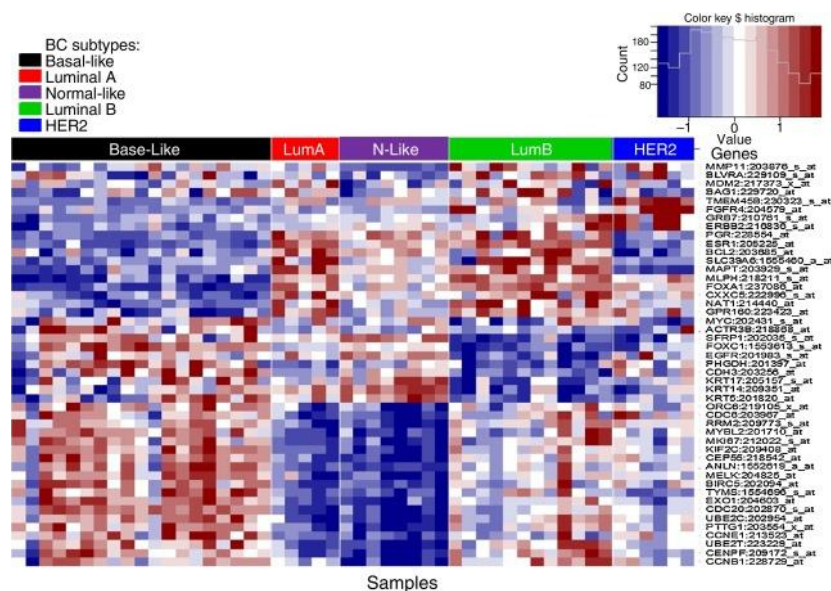


Figura 8. Ejemplo de clasificación de subtipos cáncer de mama usando PAM50. PAM50 (Análisis de Predicción de Microarray 50), es una plataforma que analiza un grupo de 50 genes de una muestra tumoral clasificándola dentro de algún subtipo de CM. Fuente: Triple negative breast cancer: Deciphering the biology and heterogeneity. Uscanga-Perales et al. Medicina Universitaria, 2016 [58].

En 2011, Lehmann y su equipo describieron seis clases diferentes dentro del CMTN (en base a 2.188 genes obtenidos de 587 muestras de tejido fresco) que diferían entre sí en su comportamiento clínico, sensibilidad a la QT y supervivencia [57]. Debido a la alta complejidad y a la variedad histológica de las muestras, Lehmann *et al* propusieron modificaciones de la clasificación inicial de seis subtipos en sólo cuatro: Tipo basal 1, tipo basal 2, mesenquimal y receptor de andrógenos luminal [59].

Subtipos moleculares del CMTN (figura 9):

- **Tipo basal 1 y 2 (BL1 y BL2):** El subtipo BL1 representa el 18% de todos los CMTN y se caracteriza por una elevada expresión de genes relacionados con el ciclo celular y con las vías de reparación del daño del ADN. Las vías de proliferación en BL1 están acompañadas de un importante aumento de las vías de respuesta al daño del ADN como son *ATR* y *BRCA* [57]. Asimismo, las pacientes con el subtipo BL1 tienen la tasa más alta de respuesta completa patológica (RCp) tras recibir QT neoadyuvante (QTN) [60].

El subtipo BL2 representa el 13% de los CMTN y se caracteriza por la exacerbación de la regulación en las vías de señalización de factores de crecimiento como *EGFR*, *MET* o *Wnt*; así siendo este el único subtipo enriquecido en receptores de factores de crecimiento [57]. Además, se ha observado que no responde de la misma manera que el subtipo BL1 a la QTN [60]. La mayoría de las líneas celulares con mutaciones en *BRCA1/2* tienen patrones de expresión génica que se relacionan con el subtipo BL 1/2 [61].

- **Subtipo Inmunomodulador (IM):** Constituye el 21% de los CMTN y muestra un aumento de la expresión de genes involucrados en las vías de señalización inmune y destaca por la sobreexpresión de la proteína 4 asociada a los linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) [62]. En la última clasificación de Lehmann, este subtipo desaparece debido a que no está claro si ese aumento en la expresión de los genes de las vías de señalización inmune es un verdadero perfil de expresión génica de las células tumorales o si es un reflejo de que el tumor tiene un importante infiltrado inmune [63]. El subtipo IM, a pesar de que tiene un alto grado histológico se asocia con un pronóstico favorable.
- **Subtipo mesenquimal y mesenquimal de tipo troncal:** Componen el 19% y el 8% de los CMTN respectivamente. Los dos modelos génicos presentan estimulación de las vías implicadas en la transición epitelio-mesénquima. El subtipo mesenquimal tiene un importante enriquecimiento de las vías asociadas a la motilidad celular, interacción con receptores extracelulares y vías de diferenciación celular; mientras que el mesenquimal de tipo troncal es el único que expresa genes asociados a células madre. Ambos subtipos presentan alto grado de alteraciones en la vía de *PI3K/AKT/mTOR* [64].

- Receptor de andrógenos luminal:** Constituye el 11% de los CMTN y es el que mayores diferencias presenta con respecto a los otros subtipos. Se definió por una expresión mediante IHQ de $\geq 10\%$ del receptor de andrógenos (RA). El RA es un tipo de receptor nuclear que se activa mediante la unión de cualquiera de las hormonas androgénicas como la testosterona. La función principal del RA es como un factor de transcripción de unión al ADN que regula la expresión génica. Sin embargo, el RA tiene funciones adicionales independientes de la unión al ADN. Este subtipo de CMTN posee un enriquecimiento en las vías reguladas hormonalmente, incluyendo la síntesis de esteroides y el metabolismo androgénico/estrogénico, manteniendo activadas la señalización a través del RA, de prolactina, *HER4*, y del RE, a pesar de que la tinción IHQ para el RE es negativa [57]. Esto puede ser debido a que el 1% de las células tumorales expresan niveles bajos de las proteínas del RE, definiéndose como negativa en la IHQ. El ácido ribonucleico mensajero (ARNm) del RA se encuentra muy expresado en este subtipo y como consecuencia se expresan múltiples genes de la vía del receptor de estrógenos y de sus coactivadores. Estos resultados explicarían por qué este subtipo tumoral es el que peor responde a QT [60].

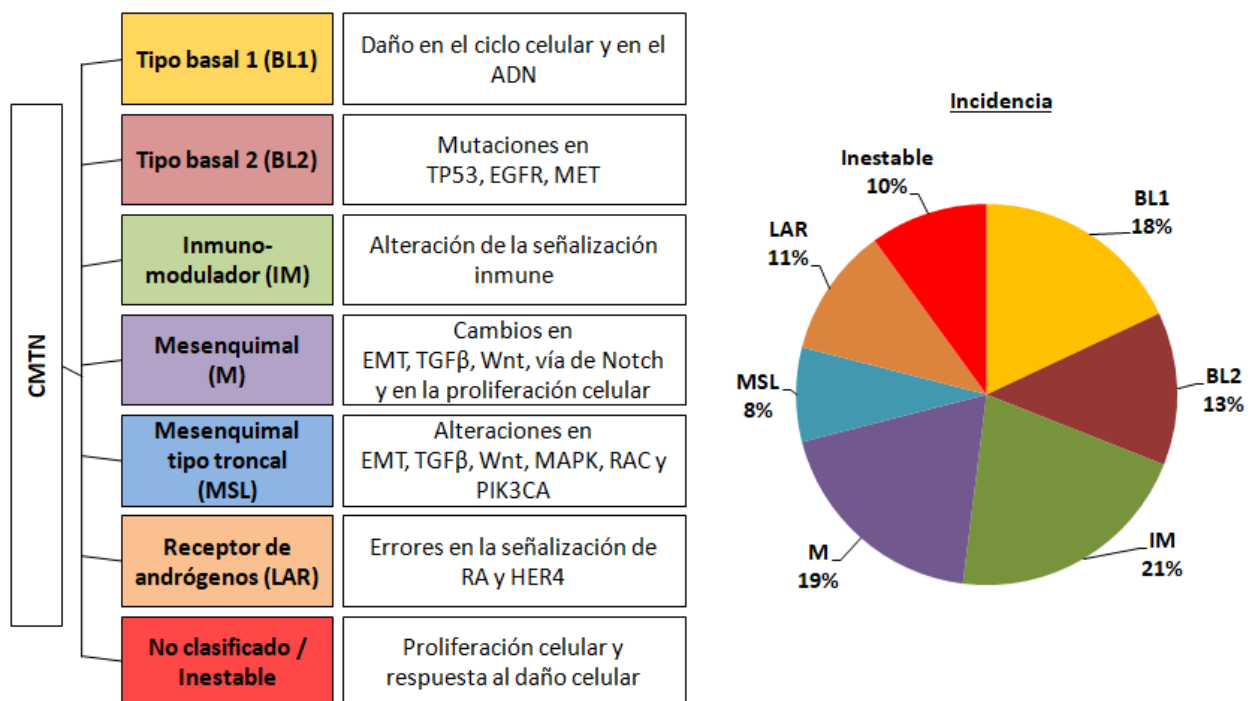


Figura 9. Características y distribución de los subtipos de cáncer de mama triple negativo (CMTN) según la primera clasificación de Lehmann [58]. Figura de elaboración propia.

1.2.3 Tratamiento sistémico del cáncer de mama triple negativo con enfermedad local o localmente avanzada

La estrategia terapéutica en el CMTN precoz incluye la QT, la cirugía y la radioterapia (RT). La elección del tratamiento debe de ser individualizada y llevada a cabo por un comité multidisciplinar formado al menos por oncólogos médicos, radioterapeutas, cirujanos, patólogos, biólogos y radiólogos. La terapia seleccionada se basa en el tamaño y ubicación del tumor primario, el número de lesiones, la afectación adenopática, así como la edad, las comorbilidades y el estado general, siempre teniendo en cuenta las preferencias de cada paciente. En pacientes premenopáusicas y jóvenes hay que tener en cuenta los deseos genésicos de las enfermas y ofrecer técnicas de preservación de la fertilidad antes del inicio de cualquier tratamiento sistémico, así como la remisión a Unidades de Consejo Genético para la realización de análisis multipanel y determinación de *BRCA1/2* entre otros.

Desde el inicio de la enfermedad, se debe considerar al CMTN como una enfermedad sistémica [65] ya que se ha observado la presencia de micrometástasis no visibles por técnicas de imagen convencionales en fases iniciales del tumor; por lo que se emplean las terapias sistémicas con QT para intentar una potencial curación. Algunos de los agentes quimioterápicos que han demostrado ser efectivos en el CMTN son las antraciclinas como la doxorrubicina; la ciclofosfamida; los taxanos; las sales de platino o las fluoropirimidinas entre otros (figura 10). Se pueden utilizar dos estrategias de tratamiento, administrar la QTN (previa a la cirugía) o QT adyuvante (posterior a la cirugía) con resultados similares en control local y tasa de supervivencia [66].

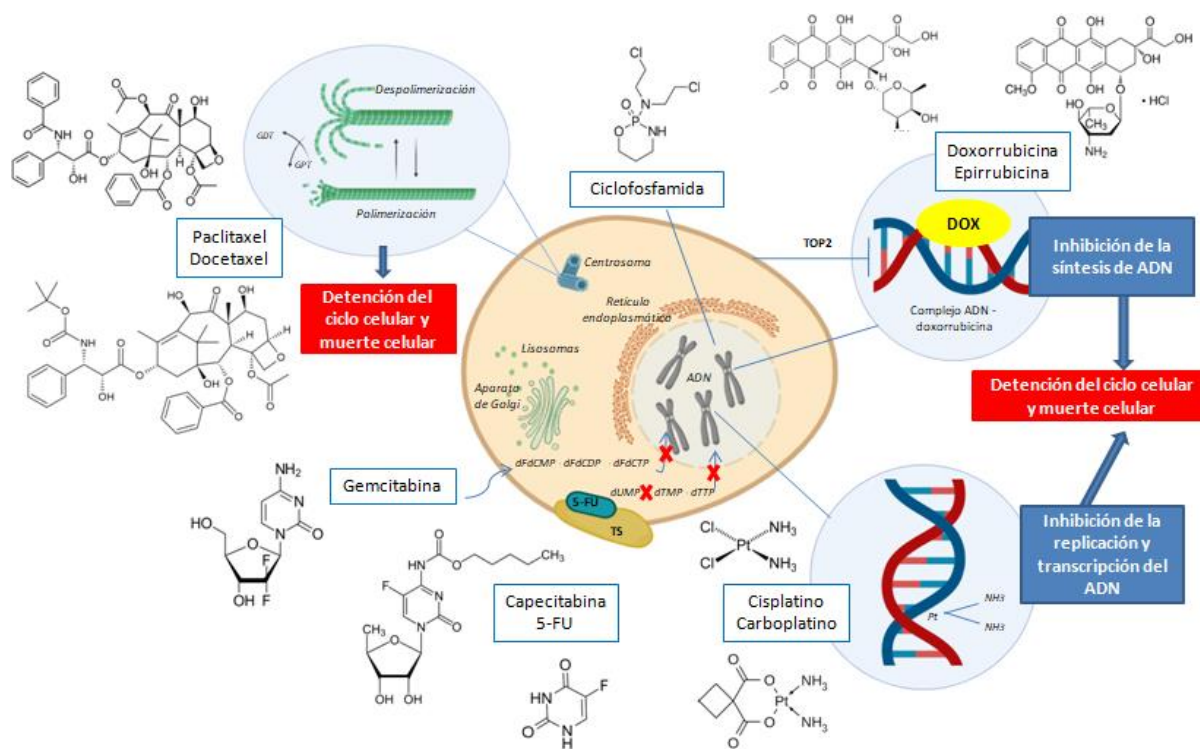


Figura 10. Mecanismos de acción de los principales agentes quimioterápicos en CMTN.

Existen varios mecanismos por los cuales la quimioterapia actúa en la célula cancerosa; promover la polimerización y estabilización de microtúbulos (taxanos); actuar como antimetabolito de pirimidina nucleósido (gemcitabina); inhibir la timidilato sintasa (5-fluorouracilo); formar enlaces cruzados de ADN (sales de platino); intercalarse en el ADN y alterar la reparación del ADN mediada por topoisomerasa-II (antraciclinas); efecto citotóxico debido al entrecruzamiento de hebras de ADN y ARN e inhibición de la síntesis de proteínas (ciclofosfamida). Comúnmente, la mayoría de ellos inhiben la replicación y transcripción del ADN y la muerte de las células tumorales. Fuente: Update on systemic treatment in early triple negative breast cancer. Nuñez Abad et al. *TherAdvMed Oncol*, 2021; [66].

La QTN es el tratamiento estándar en tumores de >2 cm y/o ganglios afectados en los subtipos luminales de alto grado, en enfermedad HER2 positiva y en CMTN [66,67]. Los principales objetivos de la QTN son aumentar la tasa de resecabilidad disminuyendo el tamaño tumoral y así poder realizar cirugías conservadoras, controlar de forma temprana la enfermedad micrometastásica y testar la quimiosensibilidad del tumor in vivo. La respuesta a la QTN puede ofrecer información pronóstica de la enfermedad [68]. Como inconveniente a la QTN encontramos el desafío quirúrgico que suponen las pacientes que presentan una progresión tumoral a esta terapia.

Varios estudios han confirmado la importancia de lograr una respuesta completa patológica (RCp) después de la QTN ya que se ha observado que confiere un mejor pronóstico y un aumento de la supervivencia [69,70]. En 2007, Symmans *et al* publicó un artículo en el que se midió la enfermedad tumoral residual después de la QTN para obtener información pronóstica evaluando la respuesta patológica. Se incluyeron 382 pacientes tratadas con distintos esquemas de QTN. Las pacientes que obtuvieron una RCp o una enfermedad tumoral residual mínima tuvieron muy buen pronóstico comparado con las pacientes en las que se encontró una enfermedad residual extensa tras la QTN [71]. Recientemente, un importante metaanálisis [72] observó que la obtención de una RCp tras la QTN se asoció con una mejoría de la supervivencia. Los pacientes que experimentaron una RCp tenían un 69% menos de probabilidades de recurrencia de enfermedad. La asociación entre la RCp y la supervivencia libre de recaída (SLR) y supervivencia global (SG) fue más fuerte entre las pacientes con CMTN, que tenían un 82% menos probabilidades de recidiva tras obtener una RCp. En el CMTN, la SLR y la SG fue favorable al grupo de los pacientes que obtuvieron una RCp frente a los que se encontró enfermedad tumoral residual, con un 90% frente a un 57% de SLR a cinco años y un 84% vs. un 47% de SG a 5 años [72].

La QTN se comenzó a utilizar en la década de 1980 en las pacientes con CM localmente avanzado, y su objetivo principal era convertir los tumores inoperables en operables [67,68]. A lo largo de estos años, se ha observado que la QTN ofrece una mayor tasa de cirugías conservadoras y puede testar precozmente la efectividad de la QT, observando unas cifras similares de supervivencia comparada con la administración adyuvante de la QT [68–70].

Durante los últimos años, se han realizado numerosos estudios para definir qué combinaciones de QT obtenían mejores tasas de RCp, considerándose el esquema secuencial de antraciclinas y taxanos el tratamiento estándar [73–75] con tasas de RCp en torno al 30%. Sin embargo, en aquellas pacientes con alto riesgo de toxicidad cardiovascular se podía sustituir este tratamiento por 4 ciclos de docetaxel y ciclofosfamida a pesar de obtener unos resultados algo inferiores [76,77]; aunque hoy en día, el esquema de carboplatino (CBDA) (AUC 6) más docetaxel trisemanal por 6 ciclos tiene una mejor tasa de RCp (52%) con un perfil de toxicidad aceptable [78]. Recientemente, se ha observado que la adición de carboplatino a los taxanos y

antraciclinas se correlaciona con mayores tasas de RCp (40-60%) e incluso en algunas publicaciones también con una mejor SLR [79–82].

Con respecto a la enfermedad residual, los pacientes que no lograron una RCp tras la QTN se pueden beneficiar de un tratamiento adyuvante posterior complementario. En 2017 se publicó el CreateX [83] y más recientemente el ensayo clínico CIBOMA/2004-01 [84], los cuales pretendían objetivar el beneficio de la capecitabina adyuvante tras la no obtención de una RCp. Ambos estudios mostraron una discreta mejoría de manera significativa de la SLR y SG en el brazo de las pacientes que recibieron capecitabina.

También el ensayo clínico Olympia [85] ha valorado la eficacia de olaparib frente a placebo como tratamiento adyuvante en pacientes con CMTN y mutaciones germinales de *BRCA1/2* que no alcanzaron una RCp después de la QTN [85]. Este estudio ha demostrado que olaparib ofrece una mejoría de SLR en pacientes con CMTN que realizaron QTN (81.4% vs. 67.7%) [86] con una SG a 4 años del 89.8% en el grupo de olaparib vs. el 86.4% en el grupo placebo [87].

Recientemente, se ha abierto un hueco para la inmunoterapia en el CMTN precoz. En los últimos años, se han publicado estudios con QTN más inmunoterapia con anti-PD-1/L1 (figura 11). Uno de estos ensayos es el GeparNuevo [88] donde las pacientes recibieron QTN asociada o no a durvalumab. Se encontró un modesto aumento de la tasa de RCp en el brazo de durvalumab (tabla 3) con mejoría de la supervivencia. El análisis por subgrupos sugirió que los pacientes con mayor expresión de TILs obtuvieron mejores resultados con mayor beneficio de durvalumab.

El ensayo clínico KEYNOTE-522 [89], mostró un beneficio significativo en la tasa RCp cuando se añadía pembrolizumab a la QT secuencial con taxanos y platinos seguido de antraciclinas y ciclofosfamida (AC), alcanzando casi un 65% de RCp (tabla 3), siendo este beneficio independientemente de la expresión de PD-L1 (ligando de la proteína transmembrana de tipo 1). Además, en la rama experimental se completaron 9 ciclos de pembrolizumab tras la cirugía. Se observó una menor tasa de recaídas tumorales y mejor SLR en el brazo de inmunoterapia [90].

Sin embargo, en el estudio NeoTRIP [91] la adición de atezolizumab a nab-paclitaxel y carboplatino no aumentó significativamente la RCp en una población de pacientes similar a la del ensayo KEYNOTE-522 [92]. Si bien, los esquemas de QTN fueron

diferentes, excluyendo las antraciclinas y la ciclofosfamida neoadyuvantes en el ensayo NeoTRIP (tabla 3), agentes quimioterápicos bastante inmunogénicos.

A finales de 2020 se publicó el ensayo IMpassion031[93] en el que se valoraba el papel de la adición de atezolizumab a la QTN basada en nab-paclitaxel semanal seguido de AC, demostrando una mayor tasa de RCp (58% vs. 41%) a favor de la rama de inmunoterapia (tabla 3).

Tabla 3. Comparación de esquemas y tasas de RCp entre los ensayos con inmunoterapia neoadyuvante en el CMTN. Tabla de elaboración propia.

Ensayo clínico	Fase	Inmunoterápico	Esquema de QTN	Tasa de RCp
GeparNuevo	II	Durvalumab	Nab-paclitaxel + antraclinas y ciclofosfamida	53.4%
KEYNOTE-522	III	Pembrolizumab	Paclitaxel y CBDA + antraclinas y ciclofosfamida	64.8%
NeoTRIP	III	Atezolizumab	Nab-paclitaxel y CBDA	43.5%
IMPassion 031	III	Atezolizumab	Nab-paclitaxel + antraclinas y ciclofosfamida	57.6%

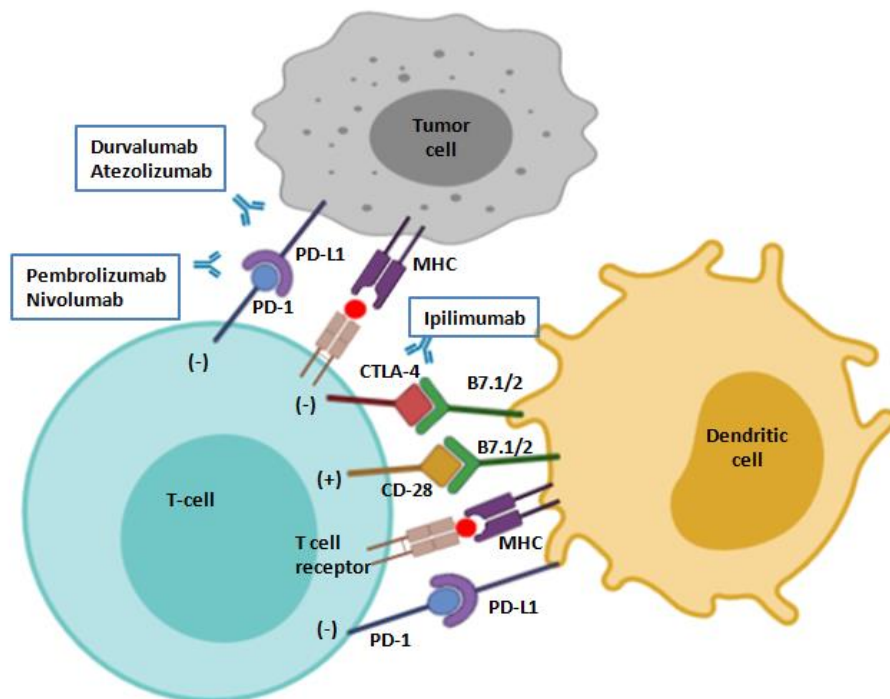


Figura 11. Mecanismo de acción de la inmunoterapia. PD-1 se expresa en las células T activadas y cuando se une a su ligando PD-L1 de las células tumorales conduce al agotamiento de los linfocitos T. CTLA-4 compite con CD28 (molécula de linfocitos T coestimuladores) por

los ligandos B7 y, tras la activación, disminuye la proliferación y la actividad de los linfocitos T. El bloqueo de CTLA-4 (ipilimumab) y PD-1 (pembrolizumab, nivolumab) o PD-L1 (durvalumab, atezolizumab) estimula las células T efectoras para producir respuestas antitumorales. Fuente: Update on systemic treatment in early triple negative breast cancer.

Nuñez Abad et al. TherAdvMed Oncol, 2021; [66].

Por lo tanto, en el tratamiento sistémico del CMTN sabemos la importancia de conseguir una RCp después de la QTN, ya que constituye el principal factor pronóstico en CMTN precoz. La RCp ocurre en aproximadamente el 35% de las pacientes tratadas con QTN utilizando el régimen estándar de antraciclinas por 4 ciclos seguido de paclitaxel semanal durante 12 semanas. Sin embargo, las pacientes que no alcanzan una RCp tienen una alta tasa de recurrencia, por lo que en estas circunstancias se beneficiarían del tratamiento adyuvante con capecitabina. Para mejorar el pronóstico de estas pacientes, actualmente se están asociando nuevos agentes a la QTN, como las combinaciones con carboplatino y la sustitución de paclitaxel por nab-paclitaxel, que consiguiendo una tasa de RCp entre el 40 al 60%, que puede incrementarse con la adición de inmunoterapia como pembrolizumab. Además, se están llevando a cabo varios ensayos con nuevos agentes terapéuticos como inhibidores de PARP, fármacos antiandrógenos, conjugados anticuerpo-fármaco o dobletes de inmunoterapia, entre otros, para conocer el impacto de diversas terapias y mejorar las tasas de curación en el CMTN precoz. Se requieren ensayos clínicos prospectivos basados en biomarcadores específicos para avanzar en la personalización del tratamiento en CMTN en un futuro próximo [66].

1.2.4 Valoración de la respuesta patológica a la quimioterapia neoadyuvante en cáncer de mama triple negativo

La valoración de la respuesta a la QTN ha sido bastante heterogénea entre los estudios, dificultando la comparación entre ellos. Existen varias clasificaciones que categorizan la RCp en función de los distintos grados de respuesta tanto en la mama como en la axila tras los cambios observados por la QTN. La RCp tras la QTN guarda una estrecha relación con las tasas de SLR y de SG, siendo en todas las series estudiadas de mejor pronóstico las pacientes que alcanzan una RCp, considerándose ésta un subrogado de la SLR y de la SG en el CMTN [94,95].

Uno de los sistemas empleados para la valoración de la respuesta patológica a la neoadyuvancia en CM y el que se utiliza en la presente tesis es el sistema de Miller-Payne [96]. Este incluye tanto la valoración de respuesta a nivel de la tumoración principal (tabla 4) como de las adenopatías (tabla 5).

Tabla 4. Valoración de la respuesta patológica local según el sistema de Miller-Payne [96].

Respuesta patológica local	
G1	Mínimos cambios sin reducción significativa de la celularidad tumoral invasiva.
G2	Reducción discreta de celularidad tumoral invasiva de <30% de la masa tumoral.
G3	Reducción marcada de celularidad tumoral invasiva entre 30% y 90% de la masa tumoral.
G4	Focos microscópicos de carcinoma invasivo.
G5	No evidencia de tumor residual invasivo.

Tabla 5. Valoración de la respuesta patológica ganglionar según el sistema de Miller-Payne [96].

Respuesta patológica ganglionar	
A	Ganglios linfáticos negativos, sin cambios atribuibles a quimioterapia.
B	Ganglios linfáticos positivos, sin cambios atribuibles a quimioterapia.
C	Ganglios linfáticos positivos, pero con evidencia de respuesta parcial.
D	Ganglios linfáticos negativos con cambios postquimioterapia.

Otro sistema ampliamente utilizado es el *Residual Cancer Burden* (RCB). El RCB clasifica a las pacientes con cáncer de mama en cuatro grupos (RCB 0-IV) según el nivel de enfermedad residual después de la terapia neoadyuvante [71]. Este sistema incluye la evaluación de las dimensiones tumorales, porcentaje del lecho tumoral con áreas de carcinoma infiltrante e in situ, el número de ganglios axilares afectados y el diámetro de la metástasis ganglionar más grande. La correlación en la respuesta completa entre los 2 sistemas de gradación es buena, con algunas discrepancias en la clasificación en la ausencia de respuesta entre ambos sistemas [97]. Tanto RCB como Miller-Payne pueden estratificar el resultado de supervivencia de las pacientes después de la QTN, obteniendo una precisión de predicción levemente superior con el sistema RCB [98].

1.3 INMUNOREGULACIÓN Y BIOMARCADORES INMUNES EN CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO

Una de las bases de la inmunología tumoral y de la vigilancia inmunológica del cáncer es que las células cancerosas expresan antígenos que las diferencian de sus homólogos no transformados. Estos antígenos son productos de genes mutados, genes normales expresados aberrantemente o genes que codifican proteínas virales. La heterogeneidad de las mutaciones en el CMTN se asocia con nuevos genes y antígenos. Se cree que la frecuencia de mutaciones somáticas o carga mutacional está relacionada con la inmunogenicidad del CM, siendo el CMTN el subtipo de CM más inmunogénico [99].

El sistema inmunitario está controlado por un equilibrio entre la inmunoestimulación y la inmunosupresión. De hecho, aunque las células del sistema inmunitario están preparadas para reconocer y neutralizar o eliminar los patógenos, no es inusual que existan linfocitos potencialmente reactivos y peligrosos, que permanezcan silentes en presencia de un antígeno y se abstengan de producir una respuesta inmunitaria perjudicial para el organismo [100].

El microambiente tumoral es un medio heterogéneo que se compone de linfocitos infiltrantes, macrófagos, fibroblastos, matriz extracelular, adipocitos y otros componentes estromales (figura 12). Este microambiente se puede ver afectado por el infiltrado de células inmunosupresoras como los macrófagos asociados al tumor, las células supresoras de origen mieloide y las células T reguladoras (Treg).

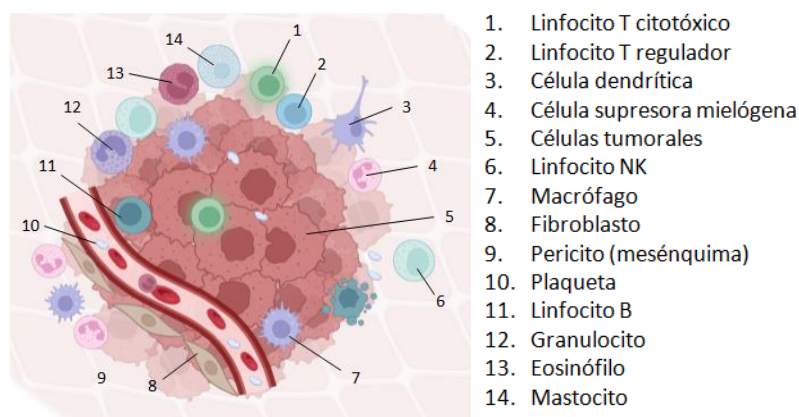


Figura 12. Imagen de elaboración propia del microambiente tumoral y células que lo componen, entre las que se encuentran las células tumorales, linfocitos T, linfocitos B, linfocitos natural killer, células dendríticas, células mielosupresoras, macrófagos, fibroblastos, mesénquima, plaquetas, granulocitos, eosinófilos y mastocitos entre otras [101].

Las células presentadoras de antígeno y las células Treg parecen desempeñar un papel esencial en la toma de decisiones sobre la conveniencia o no de una respuesta inmunitaria, así como de su intensidad. Existe una compleja red de citoquinas y de interacciones entre receptores y sus ligandos en la superficie tanto de las células T como de las células presentadoras de antígeno que toman parte en este control regulatorio [100].

1.3.1 Biomarcadores inmunes en tejido tumoral en cáncer de mama triple negativo

Existe una estrecha relación entre el sistema inmunológico y el desarrollo del cáncer. La respuesta inmunológica tiene el potencial de destruir específicamente células tumorales, sin dañar el tejido sano del cuerpo y de crear una memoria inmune a largo plazo capaz de prevenir recurrencias. El sistema inmunológico tiene por un lado la capacidad de detectar y eliminar células tumorales y por el otro, puede proveer un microambiente favorable para el crecimiento tumoral. Debido a la función dual de algunas citocinas y moléculas del sistema inmune, aún no se ha podido distinguir con claridad la inmunidad inflamatoria promotora de tumores de la inmunidad supresora de tumores. La inflamación crónica en el microambiente tumoral y la capacidad del tumor para evadir la respuesta inmune son factores condicionantes para la oncogénesis [102]. El microambiente tumoral consta de células cancerosas, células inflamatorias y células estromales. Las interacciones dinámicas de las células que forman parte de este microambiente dictaminan las condiciones ambientales en las que se produce el desarrollo de tumores. Hay evidencia suficiente para apoyar que las células inmunes en el microambiente tumoral pueden promover o inhibir eficazmente crecimiento tumoral, lo que podría ser un indicador pronóstico también para el CM. Las células inmunes en CM son principalmente linfocitos T (70%-80%), y el resto está compuesto por células natural killer (NK), linfocitos B, macrófagos y células presentadoras de antígeno. A día de hoy, hay un alto nivel de evidencia de que la inmunidad celular y humoral influye en el pronóstico del CM precoz, en particular en el subtipo de CMTN [102].

En varios estudios, se ha demostrado que la presencia de linfocitos infiltrantes de tumores (TILs) constituye el factor pronóstico más constante en el CMTN [103], lo que implica al sistema inmunitario en la fisiopatología [102–104]. La estratificación del CMTN basada en la evaluación cuantitativa de los TILs distingue un subgrupo

denominado "caliente" (alto porcentaje de TILs) y otro de tumores "fríos" (bajo porcentaje de TILs), que parece que se correlaciona con la respuesta a la inmunoterapia. El punto de corte para considerar a un tumor como alto expresor de TILs varía entre el 30 al 50% dependiendo del ensayo. Se ha comprobado que una mayor infiltración linfocitaria en la biopsia inicial puede predecir una mayor tasa de RCp tras neoadyuvancia así como un mejor pronóstico en CMTN precoz con independencia del tratamiento sistémico empleado, confiriendo una mejoría de alrededor de un 10% en SLR y SG por cada aumento del 10% de TILs [77,105,106].

Aparte, la expresión de TILs también puede ser un factor predictivo de respuesta a QT con carboplatino en neoadyuvancia [107]. En estadios muy precoces de CMTN, en base a estudios retrospectivos, se ha observado que los pacientes con alta expresión de TILs tienen una SLR y una SG similar independientemente de haber recibido o no QTN [107]. En el análisis publicado por Park *et al* a finales de 2019 [108] se incluyeron datos de 476 pacientes de 4 centros intervenidos de CMTN localizado, los cuales no habían recibido ningún tratamiento con QT. La expresión media de TILs fue del 10%. En pacientes con tumores en estadio I patológico con TILs $\geq 30\%$, la SLR a 5 años fue del 91%, la supervivencia libre de metástasis del 97% y la SG fue del 98% [108], siendo estos resultados superponibles a los pacientes tratados con QT.

Además, el grupo del estudio PARADIGM [109] investigaron el valor pronóstico de los TILs estromales para determinar si todas las mujeres menores de 40 años con CMTN y sin afectación ganglionar se benefician de la QT. Para la inclusión en el estudio, los investigadores revisaron el Registro de Cáncer de los Países Bajos del año 1989 al 2000 para identificar a todas las mujeres menores de 40 años que fueron diagnosticadas de CMTN con ganglios negativos y que no recibieron tratamiento sistémico. El análisis incluyó a 481 pacientes con una mediana de edad de 35 años. Se encontró una SG a 15 años del 59% en pacientes con TILs estromales $<30\%$; una SG del 76% en pacientes con TILs entre 30 y 75% y un 93% de SG en pacientes de muy bajo riesgo, con TILs estromales $\geq 75\%$ [109]. Sin embargo, los datos del papel de los TILs como posible biomarcador para la desescalada provienen de estudios retrospectivos y necesitan de confirmación en cohortes prospectivas.

Asimismo, también se ha observado que una menor expresión de TILs en la enfermedad residual tras la QTN se asocia a la activación de la vía *RAS/MAPK* y a peor SG [105].

El tipo de células linfocitarias que se encuentran en el microambiente tumoral también puede ser igual de importante que la proporción de TILs. Actualmente, el impacto pronóstico de los distintos subgrupos de TILs en el CMTN es controvertido. Entre los principales mecanismos inmunorreguladores que se han descrito en el CMTN se encuentran los linfocitos T. Sin embargo, las asociaciones entre los niveles de diferentes subconjuntos de células T y subtipos moleculares de CM, así como otros factores pronósticos aún no se han establecido completamente.

Los linfocitos T CD4+ o linfocitos T colaboradores, ayudan a coordinar la respuesta inmunitaria al estimular otras células inmunológicas, como los macrófagos, los linfocitos B y los linfocitos T CD8+ para combatir la inflamación. Las células efectoras CD8+ son linfocitos que, cuando se activan, ejecutan la vigilancia inmune; mientras que los linfocitos T reguladores (Treg) o FOXP3+ son inhibidores e impiden las respuestas inmunes previniendo la activación excesiva, pero en el microambiente tumoral pueden actuar como inhibidores de la respuesta antitumoral.

Algunos estudios sugieren que las pacientes con alta expresión de linfocitos T CD4+ tienen una peor SLR y SG; con una alta correlación entre el aumento del cociente CD4/CD8 y la afectación ganglionar y progresión tumoral en CMTN precoz, mientras que otros trabajos no muestran diferencias significativas [110–112].

Diversas publicaciones en CM mostraron que la infiltración de TILs CD8+ se asociaba con un buen pronóstico, mientras que otros análisis encontraron una correlación negativa o ninguna correlación con el pronóstico de la enfermedad [110,113–115].

La publicación realizada en 2020 por Jamiyan *et al* [116] reveló que el aumento de TILs intratumorales CD4+ y de CD8+ estromales en CMTN precoz se relacionaba con un buen pronóstico con mejoría de SLR y de la SG. Por el contrario, un nivel bajo de linfocitos FOXP3+ se correlacionó con una mejor SLR. La expresión conjunta de los TILs no fue significativa desde el punto de vista pronóstico.

Algunos estudios en pacientes con CM mostraron que los infiltrados más elevados de FOXP3+ y más bajos de células CD8+ en el tumor se asociaban con una mayor afectación ganglionar [117]. Sin embargo, en el estudio de Denkert *et al* concluyó que la expresión de FOXP3+ no tenía influencia pronóstica en una serie de pacientes con CM, posiblemente debido a la asociación con otros subgrupos de células inmunes y otros

factores pronósticos [107]. En otro artículo en pacientes de CM que habían recibido QTN se observó que en las enfermas que tenían una disminución en los linfocitos FOXP3+ circulantes tras la QTN respondieron mejor al tratamiento, mientras que los linfocitos FOXP3+ permanecían invariables en aquellas pacientes no respondedoras [118,119].

El subtipo CMTN se asoció con una mayor proporción de linfocitos Treg en comparación con el subtipo luminal. Un mayor porcentaje de linfocitos Treg se correlacionó con un aumento en el nivel de Ki67, un mayor tamaño tumoral de los tumores y la presencia de metástasis en los ganglios linfáticos y por lo tanto una peor supervivencia [120]. Estos resultados sugieren que las células Treg son responsables de la inmunosupresión en el CM, pudiendo ser este un marcador pronóstico de la enfermedad [118].

También se ha observado que una mayor cantidad de células B CD20+ se correlacionan con una mayor supervivencia en el CM. Estos infiltrados se encuentran principalmente en la periferia de los tumores y, de manera similar a los subconjuntos de células T, se asocian con el subtipo de CMTN [121].

Se ha descrito que muchos de los agentes quimioterápicos utilizados en CMTN son capaces de promover la respuesta inmunitaria antitumoral principalmente por su capacidad para inducir una muerte inmunogénica de las células tumorales [122]. Como ejemplo están las antraciclinas las cuales inducen la activación de células dendríticas [123,124]. Asimismo, se ha observado que la doxorubicina aumenta la proliferación de linfocitos T CD8+ específicos frente a antígenos tumorales [125]. Los taxanos incrementan la actividad de las células NK y favorecen la infiltración leucocitaria [126,127]. La ciclofosfamida, a dosis bajas, inhibe la actividad de las células Treg por la disminución del factor de transcripción FOXP3. Estos datos evidencian la importancia de la respuesta inmunitaria en el tratamiento del CMTN, demostrando que, en gran medida, el éxito terapéutico de los quimioterápicos se debe a su capacidad de estimular una respuesta inmunitaria antitumoral [128].

A pesar de la acción del sistema inmunitario para atacar el cáncer, se puede producir una evasión de la destrucción inmune mediante mecanismos como la expresión del ligando de la proteína transmembrana de tipo 1 (PD-L1) en las células tumorales, que posee un papel inmunosupresor al unirse con sus receptores PD-1 o B7, transmitiendo

una señal inhibitoria a los linfocitos T los cuales reducen su proliferación y disminuyen la respuesta inmune [129]. PD-1 se expresa principalmente en diferentes células inmunes y tiene dos ligandos, PD-L1 (B7-H1 o CD274) y PD-L2 (B7-DC o CD273). Aunque la interacción de PD-1/PD-L2 muestra una afinidad de 2 a 6 veces mayor en comparación con la interacción de PD-1/PD-L1, PD-L1 se considera el ligando principal de PD-1. PD-L1 no se detecta en el tejido mamario normal y se ha descrito su expresión en alrededor del 10% de las neoplasias de mama, especialmente en aquellos tumores con receptores hormonales negativos, con elevada proliferación y de alto grado. Se estima que más del 20% de los CMTN expresan PD-L1, pudiendo llegar al 50-60% en algunos casos. Además, la expresión tumoral de PD-L1 (definida como la tinción de membrana de al menos el 1% de las células tumorales) y la existencia de TILs con PD-1 positivo se han asociado a un grado histológico elevado, negatividad para RE y una mayor infiltración linfocitaria del tumor. Muenst *et al* [130] publicaron en 2015 el primer estudio que demostró que la expresión de PD-L1 es un factor pronóstico negativo en el CM. La expresión de PD-L1 se asoció significativamente con la edad, un mayor tamaño tumoral, el grado del tumor, el estado de los ganglios linfáticos, la ausencia de expresión del receptor de estrógeno, la amplificación de *HER2* y una alta expresión del marcador de proliferación Ki-67. En una publicación reciente de Noske *et al* [131], se correlacionó positivamente la expresión de PD-L1 en el CM con una mayor presencia de TILs, siendo esta expresión superior en el subtipo de CMTN [131]. En otro estudio en el que se analizaron los datos de secuenciación de ARN del Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA) se constató que la expresión del gen de PD-L1 es significativamente mayor en los CMTN que en otros subtipos y se asocia a la pérdida del gen *PTEN* (homólogo de fosfatasa y tensina). Otros estudios que examinaron la expresión de PD-L1 y PD-L2 en pacientes con CMTN en estadios localizados mostraron que el alrededor del 55% y del 50% respectivamente eran positivos [132]. Inesperadamente, a pesar de una tasa de recaída más alta en pacientes con PD-L1 positivo, su supervivencia global fue mejor que en pacientes con PD-L1 negativo, un hecho que se atribuye a una respuesta inmune antitumoral subyacente más fuerte debido al tratamiento [130]. Además, la concentración de proteína PD-L1 se ha correlacionado positivamente con la expresión de otros reguladores inmunitarios, como CTLA-4 (antígeno 4 del linfocito T citotóxico) e indolamina 2,3-dioxigenasa 1 (IDO1) así como con la mutación del gen *BRCA1* [133]. Sin embargo, todavía hay gran variabilidad en el

análisis de la expresión de PD-L1, pudiendo observarse hasta un 40-50% de diferencias dependiendo del anticuerpo empleado para su detección [134,135].

A pesar de su discordancia en cuanto a las concentraciones absolutas de PD-L1 comunicadas en CM, los datos de los estudios mencionados previamente, apoyan que las terapias con inhibidores de puntos de control inmunológicos tienen el potencial de mejorar el pronóstico del CMTN al aumentar la eficacia de la respuesta inmunitaria asociada al tumor para eliminar las células del CMTN. Actualmente están en curso una serie de estudios con inhibidores de PD-1 y PD-L1 en combinación con QT, RT, terapias dirigidas y otros inhibidores de puntos de control. Estos enfoques combinados podrían suponer una esperanza para mejorar los resultados actuales y poder validar alguno de estos fármacos en la práctica clínica diaria en el CMTN [136].

El CTLA-4 es un receptor proteico situado en la membrana celular de los linfocitos T. La función del linfocito T se ve inhibida por la estimulación del receptor CTLA-4. Se ha encontrado una sobreexpresión significativa de CTLA-4 superior al 50% en el CMTN [137], relacionándose la alta expresión de CTLA-4 con una mejor SLR y SG [138,139]. Además, también se ha relacionado el aumento de la expresión de CTLA-4 con el CMTN *BRCA1* mutado debido a su mayor expresión de genes inmunomoduladores y una mayor carga mutacional somática [140].

El cáncer alberga numerosas alteraciones genéticas somáticas, aunque solo una pequeña proporción de éstas le confiere una ventaja selectiva [141,142]. Varios estudios de secuenciación masiva en el CMTN han revelado la presencia de muchas alteraciones en genes conductores [143–145]. El CMTN es el subtipo histológico de CM que tiene una mayor media de mutaciones por megabase [143]. Se han propuesto distintas clasificaciones genómicas para el CM agrupando las alteraciones detectadas mediante la *Next Generation Sequencing* (NGS) en genes conductores de acuerdo con las vías intracelulares en las que se encuentran involucrados, como la señalización de las vías de *PI3K/AKT* y *RAS/MAPK*, la reparación de daños en el ADN y la regulación del ciclo celular [143,144,146].

La mayoría de las mutaciones somáticas en el CMTN ocurren en genes supresores de tumores (por ejemplo, *TP53*, *RB1* y *PTEN*), los cuales actualmente no tienen diana terapéutica. También se han descrito mutaciones a nivel del gen *PIK3CA*, amplificaciones de *AKT* y mutación o pérdida de *PTEN*, con potenciales medicamentos

diana que pueden ser valorados dentro de ensayos clínicos. En el estudio del grupo de Nik-Zainal [147], analizaron 560 muestras de pacientes con CM donde se identificaron alteraciones en un total de 93 genes conductores [147]. Los 10 genes mutados con mayor frecuencia representaron el 62% de la muestra [141,147].

El gen *TP53* codifica la proteína p53 y es imprescindible para el correcto funcionamiento del ciclo celular y la reparación del ADN. Las mutaciones de *TP53* se relacionan con la carcinogénesis y la progresión tumoral, al ser incapaz de poner en marcha los mecanismos de reparación dando lugar a la acumulación del daño del ADN. Hasta en un 50% de los tumores de mama se detectan mutaciones de *TP53*, llegando al 80% en el CMTN [148]. Se asocia más frecuentemente con subtipos de mayor agresividad como el CMTN y el HER2, así como en tumores de mayor índice proliferativo y en pacientes portadoras de la mutación *BRCA1*, lo que supone un peor pronóstico y menor supervivencia [149]. La alteración de *TP53* se considera un factor de mal pronóstico, sin embargo, diversos estudios con QT basada en antraciclinas y taxanos no han demostrado una asociación entre las alteraciones de *TP53* y la predicción de respuesta [150,151].

La mutación de los genes supresores de tumores *BRCA1/2* acontece del 10 al 35% de las pacientes con CMTN y puede ocurrir tanto en vía germinal como somática. Se ha observado en estudios previos que las pacientes con mutación *BRCA1* en CMTN tienen más probabilidades de tener un mayor grado y carga tumoral en comparación con la mutación de *BRCA2* [152].

Los tumores con alteraciones genéticas que promueven la activación de la vía *PI3K*, se encuentran con mayor frecuencia en los subtipos moleculares mesenquimal y receptor de andrógenos. La desregulación de la señalización a través de la ruta de señalización de la fosfatidil inositol3 quinasa (*PI3K*) y quinasa *AKT* es una de las aberraciones oncogénicas más frecuentes de CMTN [141]. A pesar de que las mutaciones en genes individuales ocurren raramente, las mutaciones activadoras combinadas en *PI3K* y *AKT*, con mutaciones inactivadoras en el homólogo de fosfatasa y tensina *PTEN*, se producen en aproximadamente en el 25% de CMTN [153].

La pérdida del gen supresor de tumores *PTEN* puede darse en un mayor porcentaje de pacientes y ha sido asociada a una resistencia al tratamiento neoadyuvante [153].

Aunque las alteraciones en los genes que codifican componentes de la vía *RAS-MAPK*, como *KRAS*, *HRAS*, *BRAF* y *MEK1/2*, no se observan con tanta frecuencia en el CMTN como en otros tipos de cáncer, el gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (del inglés, *Epidermal Grow Factor Receptor*, *EGFR*) se expresa altamente en el CMTN (entre un 30 a 60%) y puede conducir a la regulación positiva de la señalización *RAS-MAPK* [154]. La expresión de *EGFR* se correlacionó significativamente directamente con el grado tumoral y el potencial metastásico, y por lo tanto, con un peor pronóstico en SLR y SG. Sin embargo, algunos estudios han relacionado la alta expresión de *EGFR* como un marcador predictivo de RCp a QTN en el CMTN [155].

El gen *MYC*, un factor de transcripción oncogénico que regula la actividad transcripcional de múltiples genes implicados en la proliferación celular, el metabolismo y supervivencia, coopera con la vía de *RAS-MAPK* impulsando la progresión tumoral en el CMTN. En el tumor primario de mama, no se ha observado que la mutación en *MYC* sea predictivo de respuesta a QTN, pero se asocia con un peor pronóstico [156].

También, otros genes que se encuentran alterados en una menor proporción en el CMTN como es el caso del gen del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (*FGFR*) pueden representar una diana terapéutica en el CMTN. La amplificación de *FGFR1* ocurre en aproximadamente el 10% de los CM, especialmente del subtipo luminal. La amplificación de *FGFR2* ocurre más raramente y se encuentra sólo entre el 1% al 2% de los tumores malignos de mama, aunque está amplificado en el 4% de los CMTN [157,158].

Respecto al gen *HER2* (productor de las proteínas de membrana HER2), los tumores con bajos niveles de HER2 se han clasificado tradicionalmente como HER2 negativos porque los medicamentos existentes dirigidos contra la proteína HER2 no fueron efectivos. Como resultado, hasta ahora, el CM con baja expresión de HER2 se ha tratado como si fuera HER2 negativo, sin embargo, nuevas terapias con anticuerpos inmunoconjugados como trastuzumab-deruxtecan han demostrado un aumento de SG en enfermedad avanzada en este tipo de pacientes con baja expresión de HER2 conocidos como HER2 low [159]. Dentro del subtipo de CMTN encontramos de un 15 a 20% de las pacientes con una expresión leve de HER2 o HER2 low, definido como 1+ o 2+ por IHQ y falta de amplificación del gen *HER2* medida por FISH. En análisis previos no se

han encontrado diferencias en cuanto a valor predictivo de respuesta a QTN ni tampoco en cuanto a supervivencia entre las pacientes de CTMN HER2 low vs. CTMN HER2 cero, tanto en la enfermedad precoz como en avanzada [160–162].

A pesar de los avances realizados hasta el momento aún quedan muchos estudios por llevar a cabo para comprender la complejidad del microambiente tumoral y el papel que cada célula ejerce en él.

1.3.2 Mediadores inmunes solubles en cáncer de mama triple negativo

Los linfocitos producen moléculas de diversa naturaleza que se denominan de un modo general mediadores solubles de la inmunidad. Los principales son los anticuerpos y las citoquinas, pero además producen diferentes sustancias séricas, como el complemento, que actúan en procesos inflamatorios. Las citoquinas son proteínas de bajo peso molecular que median en la comunicación intercelular de células inmunes con células del estroma tumoral y desempeñan funciones clave tanto en la inmunidad innata como adaptativa. Además de su importancia en los procesos inflamatorios, las citoquinas regulan procesos implicados en la progresión tumoral, tales como la proliferación, la supervivencia, la migración celular, la angiogénesis, la estimulación de la transformación epitelio-mesenquimal, la activación de células inflamatorias o promoviendo la evasión de las células cancerosas a la respuesta inmune. No obstante, el papel de las citoquinas inflamatorias en el contexto tumoral resulta complejo, ya que también pueden desempeñar acciones antitumorales dependiendo de diversos factores del microambiente tumoral. Durante la respuesta inmunitaria las citoquinas transmiten señales entre diferentes tipos celulares. Los principales tipos de citoquinas son: las interleucinas (IL), los interferones (IFN), los factores de necrosis tumoral (TNF), los factores estimulantes de colonias (CSF) y el factor de crecimiento transformador (TGF) (figura 13).

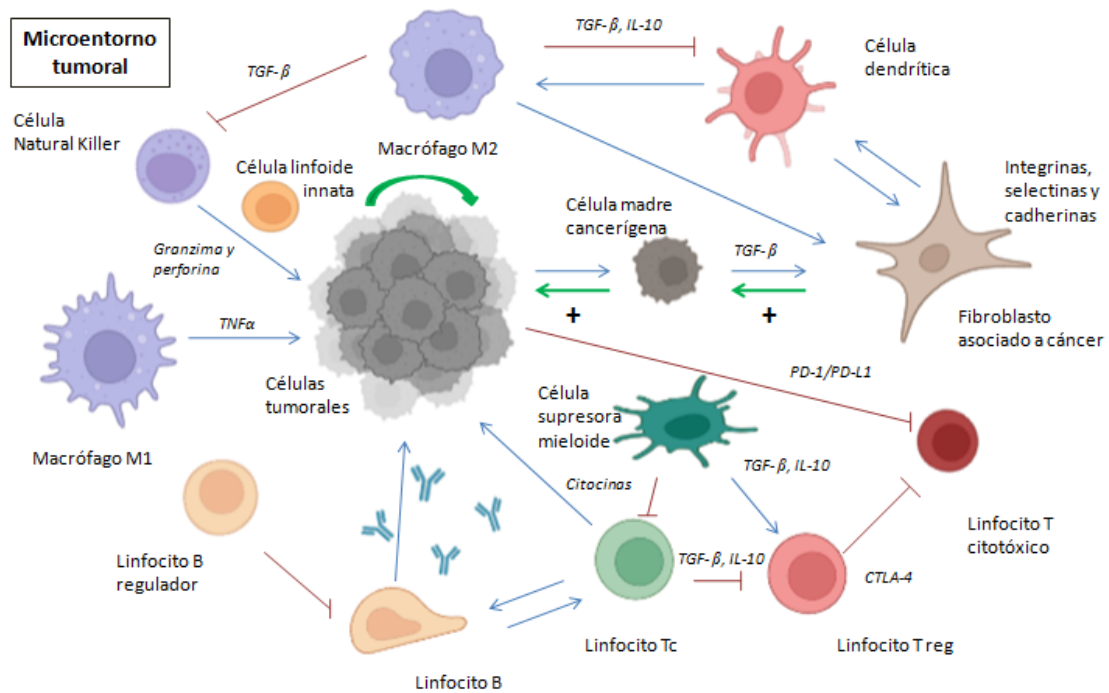


Figura 13. Dibujo esquematizado de elaboración propia del microentorno tumoral e interacciones celulares. El microentorno tumoral es una red compleja y multifacética de interacciones entre diferentes tipos de células y componentes no celulares que rodean al tumor. Consta de fibroblastos, fibroblastos activados, células inmunes, células endoteliales, componentes de la matriz extracelular y factores solubles entre otros [101].

Las interleucinas o interleuquinas son un conjunto de citoquinas sintetizadas por los leucocitos, aunque en algunos casos también pueden fabricarse por células endoteliales, del estroma del timo o de la médula ósea y tienen un papel importante de regulación del sistema inmunológico. En estudios recientes, se ha comprobado que las interleucinas como IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-21, IL-23 entre otras, determinan el establecimiento, la proliferación y la migración en el CM, afectando a la invasión y metástasis de la enfermedad, induciendo angiogénesis y crecimiento tumoral, actuando así como factores de mal pronóstico y de recaída de enfermedad, pudiendo detectarse tanto a nivel tisular como en plasma [163,164].

Los interferones, son un grupo de proteínas señalizadoras producidas y secretadas por las células anfitrionas como respuesta a la presencia de diversos patógenos. La activación de la señalización del IFN puede contribuir a la progresión y propagación de la enfermedad en el CMTN [165].

Los factores de necrosis tumoral (TNF) son proteínas del grupo de las citoquinas liberadas por las células del sistema inmunitario que intervienen en la inflamación y la apoptosis. El TNF- α se ha correlacionado con el crecimiento del CMTN a través de la regulación mediante retroalimentación positiva de la proteína que interactúa con la oncoproteína B [166,167].

Los factores estimulantes de colonias (del inglés, *colony stimulating factor*, CSF) son hormonas naturales que controlan la producción de células sanguíneas circulantes por la médula ósea. El CSF de Granulocitos y Macrófagos (GM-CSF) es una citoquina involucrada en la proliferación y diferenciación de los precursores de células mieloides. El GM-CSF se ha relacionado con una ralentización en el crecimiento tumoral en el CM al privar a los tumores de oxígeno y nutrientes debido al aumento de los niveles del factor de crecimiento endotelial vascular 1 (VEGF-1) bloqueando la actividad del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y previniendo de esta manera la angiogénesis [168].

Los factores de crecimiento son un conjunto de sustancias, la mayoría de naturaleza proteica que junto con las hormonas y los neurotransmisores desempeñan una importante función en la comunicación intercelular. La función principal de los factores de crecimiento es la del control externo del ciclo celular. Se ha observado que la expresión positiva de TGF- β se encuentra en alrededor de la mitad de las pacientes con CMTN. Los altos niveles de expresión de TGF- β se asociaron a un mayor grado histológico del tumor y afectación ganglionar. Además, cuando los niveles de expresión de TGF- β 1 se mantienen altos tras el tratamiento con QTN y cirugía, hay una menor SLR y SG [169].

A parte de las citoquinas, también nos podemos encontrar en el cáncer mediadores solubles inmunes como sPD-1, sPD-L1, sPD-L2, sCTLA-4 o el mediador soluble del gen de activación del linfocito 3 (sLAG3, del inglés, *soluble lymphocyte activation gene-3*) entre otros. A pesar de que este tipo de biomarcadores inmunes están más establecidos en tejido tumoral, estudios recientes han revelado formas solubles, probablemente secretadas por las células inmunitarias. Hay evidencia de que estos puntos de control solubles están involucrados en la regulación inmune positiva o negativa y que los cambios en sus niveles plasmáticos afectan el desarrollo, pronóstico y tratamiento del cáncer [170].

Sin embargo, actualmente, tanto el valor predictivo como pronóstico de estos biomarcadores no invasivos en el CMTN precoz son todavía objeto de estudio.

1.4 BIOPSIA LÍQUIDA EN CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO

El ADN tumoral circulante (en inglés, ctDNA) se refiere al ADN que proviene de células tumorales y se encuentra en el torrente sanguíneo. De pequeño tamaño (aproximadamente 150-180 pb), es liberado por las células tumorales al torrente sanguíneo mediante procesos de apoptosis y necrosis fundamentalmente. En los pacientes oncológicos, este ctADN procede tanto de células cancerígenas como de células sanas, por lo que existe una mezcla de ambos en la sangre. La fracción de ctDNA varía desde menos del 0.1% hasta el 30% de la fracción de ADN circulante total, dependiendo de múltiples factores como el estadio tumoral o el recambio celular.

La biopsia líquida, permite realizar una prueba molecular en una muestra de tejido biológico no sólido, principalmente sangre pero también puede ser en el líquido pleural, cefalorraquídeo o ascítico. Esta técnica se usa principalmente como una herramienta para el diagnóstico y el seguimiento de enfermedades neoplásicas y su finalidad es el análisis de células tumorales circulantes, de ctDNA libre de células o de exosomas proporcionando una representación prácticamente completa del tumor. Presenta además la ventaja de ser una técnica mínimamente invasiva pudiéndose realizar con más frecuencia, lo que permite monitorizar los tumores y las mutaciones a lo largo del tiempo [171].

El CMTN representa una enfermedad heterogénea con diferentes características biológicas y resultados clínicos. Los recientes avances en tecnologías de secuenciación masiva han permitido la caracterización genómica de genes conductores y mutaciones accionables, además de establecer una clasificación que integra la genómica y transcriptómica.

Actualmente, a pesar del gran progreso realizado en la detección de ctDNA para determinar el pronóstico y evaluar la respuesta de la QTN en pacientes con CMTN, el ctDNA rara vez se usa para la detección temprana de la enfermedad y la detección de la respuesta al tratamiento [172]. Varios estudios con muestras pequeñas ya han

demostrado el beneficio de la detección de ctDNA para la toma de decisiones terapéuticas, aunque precoz para su implementación de manera rutinaria [173–175].

En un estudio publicado en 2019 por García-Murillas [176] se asociaba la de detección de ctDNA posterior a la QTN en pacientes con CM localizado con un alto riesgo de recurrencia de la enfermedad, ya que en casi el 80% de las recurrencias habían detectado previamente ctDNA, siendo el tiempo medio entre la detección de ctDNA y la recaída de 10.7 meses. La detección de ctDNA en el momento del diagnóstico también se asoció con una peor SLR en el CM precoz. Además, se ha demostrado que los niveles de ctDNA varían en función de los subtipos de CM, siendo más altos en el CMTN y más bajos en los subtipos luminales A y B [176,177].

En 2022 [178] Papakonstantinou *et al.* publicaron un metaanálisis que incluyó 11 estudios en el que se investigaba el valor pronóstico del ctDNA en pacientes con CM tratados con QTN. La detección de ctDNA tanto al inicio como después de completar la QTN, se asoció significativamente con una peor SLR y SG. Por el contrario, la detección de ctDNA no se asoció con la probabilidad de lograr una RCp [178].

Actualmente, a pesar de los diversos trabajos en el campo del CMTN, aún queda un largo camino en la búsqueda de biomarcadores que nos ayuden a seleccionar a pacientes que puedan beneficiarse de determinadas terapias y nos proporcionen una información valiosa para identificar a subgrupos de peor pronóstico. Es por ello, que el objetivo del presente estudio es buscar con diferentes aproximaciones nuevos biomarcadores en CMTN.

2 HIPÓTESIS DE TRABAJO

La **hipótesis principal del presente estudio** en base al conocimiento actual es que el microambiente tumoral, tanto a nivel tisular como en circulación (incluyendo las citoquinas y los analitos reguladores del sistema inmune) tienen un papel determinante en el desarrollo y evolución del cáncer de mama triple negativo (CMTN). Su estudio en profundidad podría ayudar a identificar a un subgrupo de pacientes con peor pronóstico.

Las distintas poblaciones de las células linfocitarias, la expresión de proteínas específicas del CMTN o los mediadores inmunes solubles pueden ser biomarcadores de la enfermedad, pudiendo determinar la supervivencia de las pacientes e incluso predecir la respuesta a la quimioterapia neoadyuvante (QTN).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO PRINCIPAL

El **objetivo principal** de la presente tesis es la identificación de biomarcadores mediante la caracterización exhaustiva del microambiente tumoral tanto a nivel tisular como en plasma en pacientes diagnosticadas de cáncer de mama triple negativo (CMTN) tratadas con quimioterapia neoadyuvante (QTN), que permita adquirir una mayor comprensión de la enfermedad, así como predecir el significado pronóstico y predictivo de respuesta a los tratamientos quimioterápicos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Descripción de las características clínico-patológicas de la cohorte de pacientes de CMTN y su relación con la supervivencia.
2. Caracterización de las biopsias tumorales previas al inicio del tratamiento mediante inmunohistoquímica de diferentes marcadores: RE, RPg, Ki-67, *HER2*, *EGFR* y RA.
3. Identificar, determinar y caracterizar el infiltrado linfocitario tumoral mediante la técnica hematoxilina-eosina, estableciendo los patrones de infiltración peritumorales e intratumorales, así como los marcadores CD4+ y CD8+, y su implicación pronóstica.
4. Analizar y cuantificar los mediadores solubles inmunes (citoquinas y puntos de control inmunológico) en las muestras basales y correlacionarlos con las características clínico-patológicas de la cohorte de pacientes de CMTN.
5. Identificar posibles biomarcadores predictivos de respuesta a la QTN a través de biopsia líquida.
6. Identificar posibles biomarcadores de supervivencia o pronósticos en plasma.

4 MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 DISEÑO Y POBLACIÓN DEL ESTUDIO

4.1.1 Tipo de estudio

Se trata de un estudio prospectivo, observacional no intervencionista, transversal, descriptivo y analítico.

4.1.2 Población y muestra del estudio

Se estudiaron todas las pacientes con diagnóstico de CMTN localizado y localmente avanzado (estadios I, II y III) tratadas con QTN previa a la intervención quirúrgica y que además cumplieron los criterios de inclusión. El seguimiento se realizó en el Hospital General Universitario de Valencia (HGUV) y en el Hospital General de Requena (HGR). El periodo de inclusión fue de enero de 2016 a octubre de 2021, con un seguimiento medio de 3 años y 6 meses. Se incluyeron un total de 42 pacientes (N=42). El control evolutivo de las pacientes se llevó a cabo de manera continua hasta el análisis de los datos en noviembre de 2022.

Todas las pacientes disponían de muestras sanguíneas previas al tratamiento, así como una biopsia con aguja gruesa de mama que se empleó para el diagnóstico anatómico-patológico y su excedente se empleó para la realización de los pertinentes estudios.

4.2 CRITERIOS DE SELECCIÓN

Para llevar a cabo una selección exhaustiva de las pacientes se establecieron los siguientes criterios de inclusión y de exclusión en el estudio.

4.2.1 Criterios de inclusión del estudio

1. Personas mayores de 18 años en el momento del diagnóstico.
2. Pacientes que hayan firmado el consentimiento informado para incorporar las muestras biológicas al biobanco y así poder utilizarse con fines de investigación biomédica.
3. Pacientes diagnosticadas de CMTN localizado o localmente avanzado confirmado mediante pruebas de imagen y técnicas histológicas.

4. No haber iniciado tratamiento con QT para el CMTN previo a la realización de la biopsia y de la extracción analítica.
5. Pacientes que tuviesen muestra suficiente para analizar los biomarcadores en tejido tumoral.
6. Pacientes que hayan cumplimentado un tratamiento con QTN debido a CMTN y se hayan sometido a intervención quirúrgica posterior.
7. Pacientes que estuviesen en el seguimiento de su enfermedad en el HGUV o en el HGR.

4.2.2 Criterios de exclusión del estudio

1. Menores de 18 años.
2. Pacientes que se negaran a participar en el estudio o que fuesen incapaces de comprender el consentimiento informado.
3. Pacientes que debutaron con enfermedad metastásica.
4. Aquellas pacientes que no recibieron QTN.
5. Personas con virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus hepatitis B o virus hepatitis C activa.
6. Enfermedad neoplásica previa o un cáncer metacrónico.

4.2.3 Muestras recolectadas

- **Biopsia con aguja gruesa (BAG):** Las biopsias se realizaron a través de una aguja de calibre 14G o 16G guiada por ecografía para obtener una muestra del tejido tumoral de la mama. En las pacientes con ganglios ecográficamente sospechosos de malignidad en la ecografía axilar, se efectuó una BAG axilar. En estas muestras recolectadas se realizaron las técnicas histológicas e inmunohistoquímicas (IHQ) de los diversos biomarcadores (figura 14 y 15).
- **Muestra sanguínea - seroteca:** Las muestras de sangre periférica de las pacientes se obtuvieron para su posterior análisis mediante venopunción previamente al inicio de la QTN (figura 14 y 15). En todos los casos, se recogió

la sangre venosa en 2 tubos de 10 ml con el anticoagulante ácido etilenodiaminatetraacético (EDTA) (*BD Vacutainer®*). Posteriormente los tubos fueron procesados en el laboratorio en un tiempo inferior a las 3 horas siguientes a la recolección de la muestra. El plasma se aisló mediante centrifugación a 4°C y luego se almacenó a -80°C hasta su análisis. Por cada tubo de EDTA, se obtuvieron aproximadamente unos 4-5 ml de plasma.

- **Pieza quirúrgica:** El término de pieza quirúrgica se empleó para designar a las biopsias excisionales que comprendían la tumoración mamaria, el tejido mamario y los ganglios extirpados en el acto quirúrgico. Se analizó la muestra quirúrgica mediante un anatómo-patólogo experto, valorando la respuesta a QTN tanto a nivel del tumor primario como ganglionar, y las características histológicas e IHQ (figura 14 y 15).

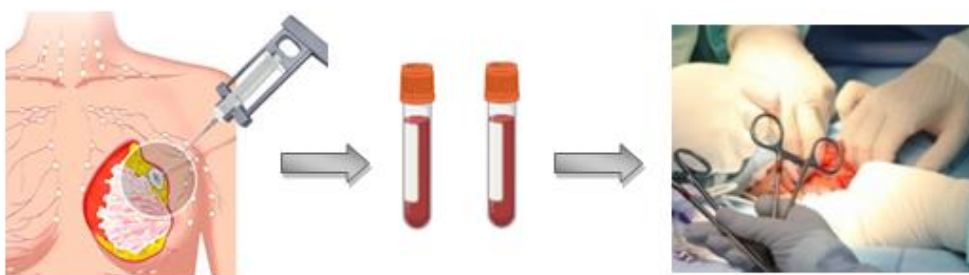


Figura 14. Representación del orden en la obtención de las muestras. En primer lugar, se biopsió la enfermedad tumoral, posteriormente se obtuvieron las muestras de sangre periférica previa a la administración de la QTN y por último se efectuó la cirugía mamaria. Imagen de elaboración propia.

4.3 PROTOCOLO DE EJECUCIÓN

4.3.1 Recogida de variables epidemiológicas y clínicas

Para cada paciente se recogieron diversas variables epidemiológicas y clínicas, creando para ello una base de datos anonimizada en *LibreOffice* y en *SPSS®* (*Statistical Package for the Social Sciences*).

Las variables epidemiológicas incluidas en el estudio fueron la fecha de nacimiento, la edad, el sexo, el estado general o performance status, el estatus menopáusico, así como las fechas de diagnóstico inicial por BAG, de inicio de tratamiento y de la intervención quirúrgica.

Las variables clínicas recogidas fueron el tamaño tumoral, la afectación ganglionar, el estadio clínico, el esquema de QTN, el tipo de intervención quirúrgica, el tamaño tumoral postquirúrgico, la afectación adenopática postquirúrgica, el estadio patológico postquirúrgico, la QT adyuvante, la RT adyuvante, la recaída tumoral (fecha y localizaciones de la recaída) así como el fallecimiento.

La estadificación de las pacientes se realizó de acuerdo con la 8ª edición de la AJCC [49]. Se consideraron tumores localizados los estadios I y II, y localmente avanzados los estadios III. Siguiendo las recomendaciones de las guías NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*) [53], las pacientes diagnosticadas de CMTN con una edad inferior a los 60 años, fueron remitidas a la Unidad de Consejo Genético del Hospital La Fe de Valencia para la realización del análisis de *BRCA1/2* en línea germinal.

4.3.2 Tratamientos realizados

Todas las pacientes incluidas en el estudio recibieron QTN, siendo administrados diversos esquemas de tratamientos. En todos los casos tras la QTN se efectuó un nuevo estudio de re-estadiaje con ecografía y resonancia magnética mamaria previo a la cirugía.

Los tratamientos realizados tras la QTN incluyeron procedimientos locales como la cirugía y la radioterapia.

La cirugía después de la QTN se llevó a cabo por cirujanos expertos de la Unidad de Mama de Cirugía General del HGUV y del HGR. Las intervenciones quirúrgicas realizadas a nivel de la mama se dividieron en cirugía conservadora guiada por arpón y mastectomía total. La cirugía conservadora o tumorectomía consistió en la extirpación de la lesión tumoral (que incluye el arpón metálico intralesional colocado por ecografía previo a la cirugía) rodeada por completo de tejido adiposo o mamario normal asegurando márgenes quirúrgicos libres. Mientras la mastectomía total radicó en la

extirpación de todo el tejido glandular mamario, incluyendo el pezón, la areola y la piel.

La cirugía ganglionar se fundamentó en la técnica de biopsia selectiva de ganglio centinela (BSGC) cuando no hubo ganglios afectados ni en las pruebas de imagen iniciales ni en las pruebas de re-estadía tras neoadyuvancia. Desde el punto de vista quirúrgico el ganglio centinela se consideró aquel o aquellos ganglios axilares que presentaron una actividad representativa y que estaban ubicados en el área preseleccionada gammagráficamente marcados previamente con el nanocoloide tecnecio-99 o con colorante azul de metileno instilado 15 minutos antes de la cirugía. Tras la extracción del ganglio o ganglios centinelas se realizó su análisis intraoperatorio mediante el método OSNA (*one-step nucleic acid amplification*) de la muestra ganglionar en fresco. El método OSNA realiza en un solo tiempo el análisis completo del ganglio centinela mediante la cuantificación de la expresión de ARNm de citoqueratina 19 (CK19) por un método de amplificación isotérmica. Si la BSGC era informada como negativa para células neoplásicas por parte del patólogo, no se continuó con la disección ganglionar; sin embargo, si esta biopsia era positiva para malignidad (CK19 mRNA ≥ 5000 copias/ μ l) se efectuó una linfadenectomía axilar completa [179]. La linfadenectomía axilar se practicó de inicio en los casos en los que se observó una clara afectación ganglionar (más de 3 ganglios en la evaluación inicial o adenopatías sospechosas en la resonancia magnética realizada tras la neoadyuvancia).

La pieza quirúrgica completa fue analizada por un anatómo-patólogo especializado en CM, valorando la respuesta a la QTN mediante el sistema de Miller y Payne tanto a nivel local como adenopático [96].

Tras obtener los resultados anatómo-patológicos de la pieza quirúrgica, y valorando el riesgo/beneficio se ofreció QT adyuvante a las pacientes que no habían obtenido una respuesta completa patológica (RCp) tras la QTN o que tenían factores iniciales de alto riesgo de recidiva (como tumores de más de 5 cm o importante afectación ganglionar). Para el tratamiento adyuvante se empleó el esquema de capecitabina 1250 mg/m² cada 12 horas durante 14 días y posteriormente una semana de descanso durante 8 ciclos.

Tras la cirugía, las pacientes que tenían un tumor primario inicial de más de 5 cm, más de 3 ganglios afectos o en las que se realizó una cirugía conservadora de la mama, fueron remitidas al servicio de Oncología radioterápica para la administración de RT

adyuvante en función de las características de cada paciente. La RT se administró entre 6 y 12 semanas después de la cirugía. Con mayor frecuencia se aplicó RT sobre toda la mama con una dosis media de 45 a 50 Gy (1.8- 2 Gy/fracción durante 5 días a la semana) añadiendo en algunos casos más dosis de radiación (10-16 Gy) sobre el lecho tumoral (*boost*). La radiación sobre cadenas ganglionares se efectuó con más de 3 adenopatías con infiltración tumoral o si había invasión capsular o de la grasa axilar.

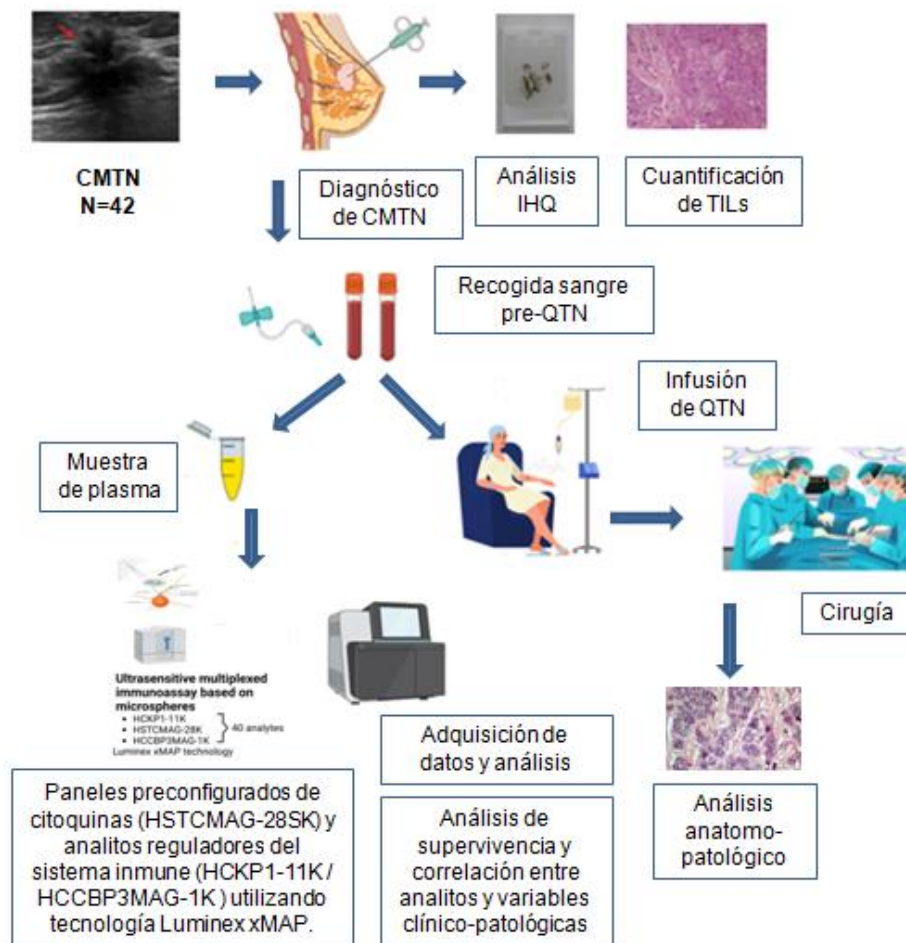


Figura 15. Diagrama de ejecución. Tras el diagnóstico de CMTN por BAG mamaria se obtuvo la muestra sanguínea para su análisis mediante immunoensayos multiplexados. Posteriormente a la extracción venosa, se administró la QTN, y entre 3 a 5 semanas después de finalizar la terapia neoadyuvante se intervino quirúrgicamente obteniendo así la pieza tumoral a partir de la cual se determinó la respuesta patológica. Figura de elaboración propia.

4.3.3 Protocolo de seguimiento

El seguimiento de las pacientes se realizó según el protocolo asistencial mediante un control clínico y analítico de manera presencial en las consultas de Oncología del

HGUV cada 21 días durante la duración de la QTN (aproximadamente 5-7 meses). Posteriormente a la cirugía, se efectuaron controles tanto clínicos como analíticos y con pruebas de imagen mediante mamografía y/o ecografía mamaria anual así como estudio de extensión con TC o PET-TC (tras la intervención quirúrgica y luego según el riesgo de cada paciente). El tiempo de control en las consultas podía variaren función de la respuesta patológica obtenida y las necesidades de las pacientes, produciéndose cada 2-4 meses de media durante los dos primeros años y posteriormente semestralmente hasta el quinto año de la intervención quirúrgica. Si durante el seguimiento existía algún signo o síntoma de sospecha de recidiva, se solicitaron las pruebas de imagen y analíticas pertinentes.

4.4 METODOLOGÍA DEL ANÁLISIS

4.4.1 Estudio histopatológico

Las variables patológicas analizadas en tejido tumoral analizadas fueron la histología tumoral, el grado histológico, el porcentaje de Ki-67, la expresión de RE, RPg y RA, la sobreexpresión y/o amplificación de *HER2*, la expresión de *EGFR*, el infiltrado linfocitario tumoral (CD4+ y CD8+) y localización peri o intratumoral, la respuesta patológica del tumor primario y la respuesta patológica ganglionar.

El tejido tumoral biopsiado fue fijado en formol al 10% entre 6 a 24 horas e incluido en parafina. Para la tinción IHQ, en primer lugar, las muestras se desparafinaron calentándolas durante 12 a 24 horas a 37°C y 45 minutos en una estufa a 60°C. A continuación, se sumergieron en xilol (dimetilbenceno) durante 15 minutos a temperatura ambiente (pases de 5 minutos). Tras esta incubación, las muestras se hidrataron con alcoholes de concentración decreciente (90-80-70%) y posteriormente se lavaron con agua. Se realizó un pretratamiento de recuperación antigénica introduciendo las secciones en una solución tampón específica (tampón citrato) y después en un autoclave (microclave selecta) hasta una presión atmosférica de 1,5 atmósferas durante cinco minutos. A continuación, se llevó a cabo una descompresión y enfriamiento lento de los preparados. Con objeto de inhibir la peroxidasa endógena, las muestras se sumergieron en una solución de agua oxigenada a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se voltearon los preparados y se le añadió el anticuerpo primario durante 45 a 60 minutos a temperatura ambiente (dependiendo del anticuerpo). Las secciones

histológicas se lavaron 3 veces con tampón fosfato y se incubaron seguidamente con el anticuerpo secundario durante 30 minutos, empleando un sistema cuya solución está constituida por una mezcla de anticuerpos. A continuación, se llevaron a cabo tres lavados con tampón fosfato y se añadió el complejo avidina-biotina durante 30 minutos. Seguidamente, se volvieron a lavar las preparaciones tres veces con tampón fosfato y se procedió al revelado de la reacción mediante una solución dediamino bencidina tetrahidroclorhídrica) en un tampón detrisclorhídrico 0,2 M hasta un pH=7. Una vez ajustado el pH se añadió la diamino bencidina tetrahidroclorhídrica y por último el agua oxigenada pura. Durante el revelado, las preparaciones se protegieron de la luz, metiéndolas en la estufa de 37°C durante 5 min, y al finalizar el revelado se lavaron con agua corriente. Se contrastaron los núcleos con hematoxilina durante 30 segundos, se deshidrataron los cortes con alcoholes crecientes (70%-80%-90%) y finalmente se realizaron varios pasos en xilol y se montaron los cubreobjetos.

Se realizó la tinción del tejido mediante la técnica de hematoxilina-eosina (H-E). La descripción del grado tumoral se efectuó mediante la visión microscópica de las células tumorales. Se asignó grado 1 a los patrones de organización y células tumorales con una apariencia cercana al tejido mamario normal. Se designó grado 2 a los tumores moderadamente diferenciados y grado 3 a tumores pobremente diferenciados.

Los niveles de expresión y la localización celular se analizaron mediante microscopía óptica. Se efectuó valoración del marcador de proliferación celular Ki-67 mediante el recuento de núcleos tumorales teñidos (anticuerpo monoclonal SP6, VITRO[®]) (tabla 6). Se consideró la expresión del 50% de Ki-67 en la muestra tumoral como el punto de corte para la realización de los análisis estadísticos, al ser esta cifra la mediana de la muestra.

Se analizaron mediante anticuerpos monoclonales determinados de VITRO[®]: la expresión de RE (anticuerpo monoclonal SP1), de RPg (anticuerpo monoclonal 16), de *HER2* (anticuerpo monoclonal SP3), de *EGFR* (anticuerpo monoclonal EP22) y del RA (anticuerpo monoclonal SP107) (tabla 6).

El resultado semicuantitativo se obtuvo con el siguiente criterio: 0, negativo (<1% de las células teñidas); 1, débil (1-10% de tinción); 2, intermedio (10-50% de tinción); y 3, intenso (+50% de tinción). Se aplicó el resultado semicuantitativo para la expresión RE,

RPg, RA y para *EGFR*. La expresión de *EGFR* fue considerada como positiva cuando se tiñeron más del 1% de las células tumorales.

Con respecto a la expresión y/o amplificación de *HER2*, se consideró positivo por IHQ cuando más del 10% de las células neoplásicas presentaron una tinción intensa y uniforme de la membrana (3+) en más del 10% de células neoplásicas. Por inmunofluorescencia (FISH), se definió positivo la identificación de 6 o más copias del gen por núcleo. Se identificó como *HER2* negativo por IHQ la ausencia de tinción o expresión de membrana débil, incompleta, en menos del 10% de células tumorales (0+). La baja expresión de *HER2* o *HER2* low se consideró si el resultado era 1+ o 2+ por IHQ, definido como tinción débil o apenas perceptible, en una proporción de células igual o superior al 10% (1+) o como la positividad de membrana no uniforme o de intensidad débil, pero completa o circunferencial en el 10% o más de células o la expresión de membrana intensa y completa pero no superior al 10% de células, pero negativo por FISH (2+). La amplificación del gen *HER2* por FISH se consideró negativa cuando el número de copias por núcleo fue inferior a 4 o el cociente *HER2*/CEP17 inferior a 2.0.

La cuantificación del porcentaje de TILs se efectuó en los cortes de la tinción hematoxilina y eosina (H-E). La densidad de TILs se determinó en base a la recomendación del Grupo de Trabajo Internacional de TIL (180), seleccionando el área intratumoral y peritumoral. Se definió como el porcentaje de todas las células mononucleares, incluidos los linfocitos en el área del estroma, como TILs, excluyéndose los granulocitos y otros leucocitos polimorfonucleares. Se consideró alta expresión de TILs cuando la cuantificación de linfocitos intra y peritumorales fue superior al 30% del tejido analizado. Para efectuar el análisis estadístico se estableció el punto de corte de TILs en el 30%, al representar esta cifra la media de TILs de la muestra.

Además, se estableció la proporción linfocitaria entre linfocitos CD4+ y CD8+. Para la tinción de CD4 se empleó el anticuerpo monoclonal de DAKO® Clon 4B12 y para la tinción de CD8 el anticuerpo monoclonal de DAKO® Clon C8/144B (tabla 6).

Tabla 6. Características de los anticuerpos empleados para la tinción IHQ de los distintos marcadores en tejido tumoral. Tabla de elaboración propia.

Marcador	Tipo de anticuerpo	Clon	Patrón de inmunotinción	Casa comercial
Ki-67	Anticuerpo monoclonal de conejo	SP6	Nuclear	VITRO®
RE	Anticuerpo monoclonal de conejo	SP1	Nuclear	VITRO®
RPg	Anticuerpo monoclonal de conejo	16	Nuclear	VITRO®
HER2	Anticuerpo monoclonal de conejo	SP3	De membrana	VITRO®
EGFR	Anticuerpo monoclonal de conejo	EP22	Citoplasmático, de membrana	VITRO®
RA	Anticuerpo monoclonal de conejo	SP107	Nuclear	VITRO®
CD4	Anticuerpo monoclonal de ratón	4B12	De membrana	DAKO®
CD8	Anticuerpo monoclonal de ratón	C8/144B	De membrana	DAKO®

En la pieza tumoral postquirúrgica se realizó un estudio anatómo-patológico completo que incluyó la descripción macroscópica y microscópica de la pieza quirúrgica. La descripción microscópica incluyó la distribución tumoral, las medidas del tumor, el tipo histológico y el grado histológico, componente de carcinoma in situ, la invasión linfocascular y perineural, todos los bordes de resección, análisis IHQ del marcador de proliferación celular Ki-67, la descripción ganglionar (incluyendo el número de adenopatías afectas) y el grado de respuesta tumoral local y ganglionar a neoadyuvancia según el sistema de valoración de Miller y Payne.

4.4.2 Técnicas analíticas

Análisis germinal de *BRCA1/2*: Las muestras sanguíneas fueron procesadas para la obtención de células mononucleares (PBMCs; del inglés, *peripheral blood mononuclear cells*) para su posterior análisis mediante NGS (*Next Generation Sequencing*). Esta técnica tiene por objetivo detectar variantes puntuales y pequeñas inserciones y supresiones en 18 genes en línea germinal relacionados con el CM hereditario. Los genes incluidos están relacionados con el control del ciclo celular y la reparación del ADN durante las divisiones celulares. Las variantes en estos genes presuponen una pérdida del control celular y de la capacidad de reparación del ADN, lo que puede implicar un mayor riesgo de desarrollar CM que en la población general. Los genes analizados incluyeron *ATM*, *BRCA 1*, *BRCA 2*, *BRIP 1*, *CDH1*, *CHEK2*, *EPCAM*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *NBN*, *PALB2*, *PMS2*, *PTEN*, *RAD51C*, *RAD51D*, *STK11* y *TP53*.

Mediadores solubles: Las muestras basales de sangre periférica se procesaron para la obtención de plasma. Este fue utilizado para medir la concentración de diferentes factores y citoquinas utilizando los paneles y kits MILLIPLEX[®]MAP basados en la tecnología LuminexxMap[®], una de las tecnologías multiplexadas más rápidas y robustas, capaz de llevar a cabo una gran variedad de bioensayos, incluyendo inmunoensayos en la superficie de microesferas magnéticas con fluoróforos, conocidas como microesferas MagPlex[®].

Específicamente, la tecnología LuminexxMap[®] se basa en el uso de microesferas magnéticas de 6.45µm internamente teñidas con fluoróforos rojo e infrarrojo a concentraciones distintas, creando sets de 80 microesferas con diferentes firmas espectrales, cada uno de los cuales es incubado con un anticuerpo específico de captura pudiendo detectar múltiples analitos al mismo tiempo. A continuación, los anticuerpos específicos de captura unidos a las microesferas se unen a los analitos diana y posteriormente, se introduce un anticuerpo de detección biotinilado, y finalmente se adiciona un conjugado de estreptavidina-ficoeritrina, detectándose así la reacción en la superficie de cada microesfera.

Un total de 39 analitos se midieron con diferentes paneles; tanto de citoquinas (Kit HSTCMAG-28SK) (tabla 7) como diversos mediadores inmunoreguladores o puntos de control inmunitarios (Kit HCKP1-11K y HCCBP3MAG-1K) (tabla 8). El análisis se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones del proveedor a través del analizador

Luminex 100-200[®], un instrumento basado en citometría de flujo que integra componentes clave de detección, como láseres, óptica, fluídica avanzada y procesadores de señales digitales de alta velocidad. El analizador luminex consta de dos láseres que miden tanto la fluorescencia de la esfera como la del anticuerpo marcado. Por un lado, el láser rojo (635 nm) excita el rojo/infrarrojo de las microesferas, clasificándolas y determinando qué analito está siendo detectado. Por otro lado, el láser verde (532 nm) determina la magnitud de la señal derivada del anticuerpo marcado enzimáticamente (ficoeritrina), la cual es proporcional a la cantidad de analito presente en la muestra.

Para la adquisición y análisis de datos se utilizó el software *Belysa Immunoassay Software* (Merck-Millipore, Darmstadt, Germany) con capacidades de análisis sofisticadas. La lectura para la concentración de cada citoquina se detectó como intensidad de fluorescencia media (*mean fluorescence intensity*, MFI). Basándonos en la medida de 7 concentraciones estándar, se utilizó una curva estándar de 5 parámetros para convertir los valores de densidad óptica en concentraciones (pg/ml). Los valores por debajo del límite detectable se les asignó el valor mínimo y los valores por encima del máximo detectable se les asignó el valor máximo [180]. Se empleó la mediana de los niveles de cada analito soluble como punto de corte para su categorización y posteriormente realizar el análisis estadístico.

Tabla 7. Panel preconfigurado de 22 citoquinas que utiliza la tecnología Luminex xMAP, kit HSTCMAG-28SK.

Citoquinas
Citoquina 11 C-X-C soluble (sCXCL-11) o Quimioatrayente alfa de células T inducible por interferón soluble (sITAC)
Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos soluble (sGM-CSF)
Fractalquina soluble (sCX3CL1)
Interferón gamma soluble (sIFN- γ)
Factor de necrosis tumoral α soluble (sTNF α)
Galectina-3 soluble (sGal-3)
Proteína inflamatoria de macrófagos 3 α soluble (sMIP-3 α)
Proteína inflamatoria de macrófagos 1 α soluble (sMIP-1 α)
Proteína inflamatoria de macrófagos 1 β soluble (sMIP-1 β)

Interleuquina 1-Beta soluble (sIL-1 β)
Interleuquina 2 soluble (sIL-2)
Interleuquina 4 soluble (sIL-4)
Interleuquina 5 soluble (sIL-5)
Interleuquina 6 soluble (sIL-6)
Interleuquina 7 soluble (sIL-7)
Interleuquina 8 soluble (sIL-8)
Interleuquina 10 soluble (sIL-10)
Interleuquina 12 soluble (sIL-12)
Interleuquina 13 soluble (sIL-13)
Interleuquina 17A soluble (sIL-17A)
Interleuquina 21 soluble (sIL-21)
Interleuquina 23 soluble (sIL-23)

Tabla 8. Panel preconfigurado de 17 analitos reguladores del sistema inmune que utiliza la tecnología Luminex xMAP, Kit HCKP1-11K y HCCBP3MAG-1K

Puntos de control inmunológico solubles
Proteína de muerte celular programada-1 soluble (sPD-1)
Ligando de la proteína de muerte celular programada-1 soluble (sPD-L1)
Ligando 2 de la proteína de muerte celular programada-1 soluble (sPD-L2)
Antígeno 4 del linfocito T citotóxico soluble (sCTLA-4)
Grupo de diferenciación 80 soluble (sCD80/B7-1)
Grupo de diferenciación 86 soluble (sCD86/B7-2)
Activación de linfocitos 3 soluble (sLAG3)
Inmunoglobulina de células T y dominio de mucina 3 soluble (sTIM-3)
Atenuador de linfocitos B y T soluble (sBTLA)
Receptores tipo Toll 2 soluble (sTLR-2)
Coestimulador inducible soluble (sICOS)
Mediador de entrada del virus del herpes soluble (sHVEM)
Grupo de diferenciación 27 soluble (sCD27)
Grupo de diferenciación 28 soluble (sCD28)
Grupo de diferenciación 40 soluble (sCD40)

Glucocorticoide inducido TNFR relacionado soluble (sGITR)
Ligando de glucocorticoide inducido TNFR relacionado soluble (sGITRL)

4.4.3 Análisis estadísticos empleados

Cálculo de tamaño muestral: Suponiendo que anualmente se diagnostican 25 pacientes de CMTN local o localmente avanzado en el HGUV y HGR, considerando que de la totalidad de las pacientes el porcentaje de mortalidad en el primer año sea como máximo de un 10%, para un nivel de confianza del 95% y una precisión o margen de error del 5% se necesitaría un tamaño muestral de 27 pacientes como mínimo.

En primer lugar, se realizó la prueba de SaphiroWilks para valorar si las variables del estudio seguían o no una distribución normal. Si $p\text{-valor} > 0.05$ se consideró que la variable no seguía una distribución normal y se utilizaron estadísticos no paramétricos (Mann-Whitney y Kruskal-Wallis). Se empleó la prueba de Mann-Whitney para la comparación de dos grupos independientes y la prueba de Kruskal Wallis para la comparación de más de dos grupos independientes. Si $p\text{-valor} < 0.05$, se estimó que la muestra seguía una distribución normal, utilizándose estadísticos paramétricos (ANOVA, T-Student).

Además, se aplicó la prueba de Fisher para estudiar la asociación entre dos variables cualitativas. Para ello, las variables continuas se transformaron en variables dicotómicas.

Los análisis de supervivencia se realizaron de acuerdo con el método de Kaplan Meier y las diferencias entre los grupos se evaluaron con el estadístico de contraste Log-rank.

Se consideró evento recaída de enfermedad la aparición durante el seguimiento de las pacientes lesiones compatibles con recurrencia locorregional o metástasis a distancia, que podían ser evidenciadas tanto en el examen físico como en estudios de imagen complementarios y de anatomía patológica.

Se definió como supervivencia libre de progresión (SLP) en meses el tiempo desde la fecha del diagnóstico histológico hasta la fecha de confirmación de la recaída local o a distancia; y la supervivencia global (SG) el tiempo transcurrido desde la fecha del diagnóstico hasta la muerte por enfermedad.

La supervivencia global (SG) se calculó a partir de la fecha del diagnóstico hasta la fecha de fallecimiento o hasta el punto de corte del estudio en agosto de 2022. El tiempo hasta la recaída (SLR) se calculó desde la fecha del diagnóstico hasta la recaída. La mediana de seguimiento de las pacientes fue de 68.5 meses.

El análisis multivariante para valorar los factores de pronóstico independiente se realizó según el método de regresión de Cox, incluyéndose todas las variables que fueron significativas en el análisis univariante.

Se consideraron resultados estadísticamente significativos si $p\text{-valor} < 0.05$. Para procesamiento de los datos, se empleó el programa estadístico R, *versión 3.5*.

4.5 CONFLICTO DE INTERESES Y COMITÉ DE ÉTICA

En este estudio no hubo ningún conflicto de interés a declarar.

La investigación realizada cumple los principios fundamentales establecidos en la Declaración de Helsinki, en el Convenio del Consejo de Europa relativo a los Derechos Humanos y la Biomedicina, así como los requisitos establecidos en la legislación española en el ámbito de la investigación biomédica, la protección de datos de carácter personal y la bioética.

Todas las pacientes incluidas en este trabajo han sido informadas y han firmado un documento de consentimiento informado específicamente elaborado, de acuerdo con los protocolos del Comité Ético y de Investigación (CEIm) del HGUV (anexo 1).

El proyecto de tesis cuenta con la correspondiente aprobación por el CEIm del HGUV (anexo 2).

La gestión de los datos recogidos como el manejo de las historias clínicas ha cumplido en todo momento con las exigencias de la Ley Orgánica de Protección de Datos (15/1999) y el RD 994/99. Los datos clínicos de las pacientes fueron recogidos por el investigador en la base de datos específica del estudio en *LibreOffice* y *SPSS versión 24.0*, siendo anónima y protegiendo así la identidad de las pacientes.

5 RESULTADOS

5.1 DESCRIPCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS BASALES DE LA COHORTE DE PACIENTES CON CMTN

Dentro de las características en la cohorte de 42 pacientes con CMTN incluidas en el estudio, diferenciamos las características basales o previas al inicio del tratamiento con QTN y las post-quirúrgicas.

5.1.1 Características de las variables clínico-patológicas

La mediana de edad al diagnóstico fue de 55 años. La paciente más joven tenía 28 años, mientras que la más longeva tenía 77 años. Todas las pacientes presentaban un buen o aceptable estado funcional (ECOG 0-1). La mayor parte de ellas eran peri o posmenopáusicas (66.6%) (tabla 9).

Respecto al tumor, el tamaño medio fue de 34.7 mm siendo T2 el más frecuente y el 61.9% presentaban afectación ganglionar al inicio de la enfermedad. La mayoría de los pacientes se diagnosticaron en estadio IIB (40.5%) seguido del estadio E-IIIC (31%) (figura 16) (tabla 9).

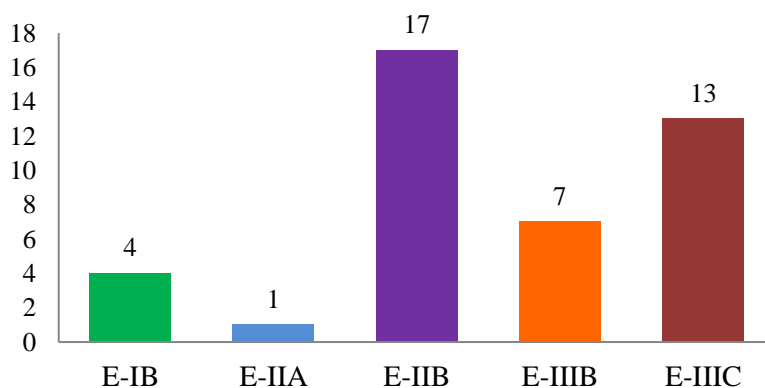


Figura 16. Número de pacientes de la cohorte de CMTN incluidas en cada uno de los estadios pronósticos según la 8ª edición de la AJCC [49].

De las 23 pacientes en las que se realizó el análisis a nivel germinal del gen *BRCA1/2* se detectaron 6 casos de mutación en *BRCA1* y 1 en *BRCA2* (tabla 9).

Tabla 9. Características clínico-patológicas basales de las pacientes del estudio, donde se incluyen la edad, el estado funcional, el estatus menopáusico, CA 15-3 basal, LDH basal, el tamaño tumoral, la afectación ganglionar, el estadio pronóstico y el análisis a nivel germinal de BRCA1/2.

Características clínicas	N:42	%
Edad al diagnóstico (media, rango)	55 [28-77]	
Estado funcional (ECOG-PS):		
0	40	95.2%
1	2	4.8%
Estatus menopáusico		
Premenopáusica	14	33.3%
Perimenopáusica	3	7.1%
Posmenopáusica	25	59.5%
CA 15-3 inicial (media, rango)	16.9 [5.4-26]	
LDH inicial (media, rango)	370 [208-658]	
Tamaño tumoral en mm (media, rango)	34.7 [8-120]	
Tamaño tumoral (T)		
T1	9	21.4%
T2	27	64.3%
T3	4	9.5%
T4	2	4.8%
Afectación ganglionar por imagen:		
SI	26	61.9%
NO	16	38.1%
Afectación ganglionar (N):		
N0	16	38.1%
N1	15	35.7%
N2	7	16.7%
N3	4	9.5%
Estadio pronóstico (8ª edición AJCC):		
IB	4	9.5%
IIA	1	2.4%

IIB	17	40.5%
IIIB	7	16.6%
IIIC	13	31%
BRCA1/2 en línea germinal:		
No criterios para su análisis	19	45.2%
No informativo	16	38.1%
BRCA1	6	14.3%
BRCA2	1	2.4%

Se utilizaron varios esquemas de QTN; el más frecuente fue el de antraciclinas seguido de taxanos, empleado en 36 pacientes, de las cuales en 14 casos se asoció además carboplatino. En 3 casos el esquema seleccionado fue un taxano con ciclofosfamida y en otros 3 casos un taxano combinado con carboplatino (tabla 10).

Tabla 10. Diversos esquemas de QTN empleados en la cohorte de pacientes con CMTN.

Esquema de quimioterapia	N=42	%
Doxorrubicina 60 mg/m ² y ciclofosfamida 600 mg/m ² día 1 cada 21 días por 4 ciclos y posteriormente paclitaxel 80mg/m ² semanal por 12 semanas.	22	52.5%
Doxorrubicina 60 mg/m ² y ciclofosfamida 600 mg/m ² día 1 cada 21 días por 4 ciclos seguido de paclitaxel 80mg/m ² y carboplatino semanal por 12 semanas.	14	33.3%
Docetaxel 75mg/m ² y ciclofosfamida 600mg/m ² día 1 cada 21 días por 4 ciclos.	3	7.1%
Docetaxel 75mg/m ² y carboplatino (AUC 6) día 1 cada 21 días por 6 ciclos.	3	7.1%

5.1.2 Características de las variables histopatológicas en tejido

La histología mayoritaria correspondió a carcinoma ductal infiltrante o NST en un 95.2% de los casos seguido del carcinoma apocrino en un 4.8%. El grado histológico más frecuente fue el pobremente diferenciados o G3 (71.4%) seguido del moderadamente diferenciado o G2 (26.2%) y solamente una paciente presentó un tumor bien diferenciado o G1 (figura 17) (tabla 11).

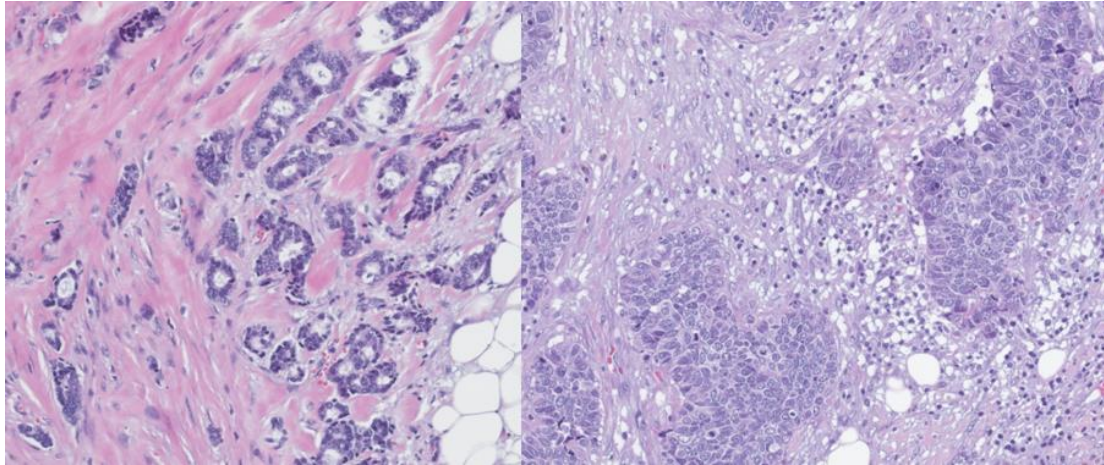


Figura 17. Imágenes histológicas de CMTN a 200 aumentos de la tinción con hematoxilina-eosina donde se observa un tumor mamario bien diferenciado en el cual las células tumorales y la organización tisular se asemejan a las células y ductos mamarios normales (izquierda), vs. uno pobremente diferenciado en el cual hay una importante desestructuración del tejido mamario con células tumorales anormales y alejadas de las características de las células normales (derecha).

El índice de proliferación medio por IHQ a través de la tinción nuclear del antígeno Ki-67 (figura 18) fue del 49%, siendo la expresión más baja de un 15% y la más elevada del 99% (tabla 11).

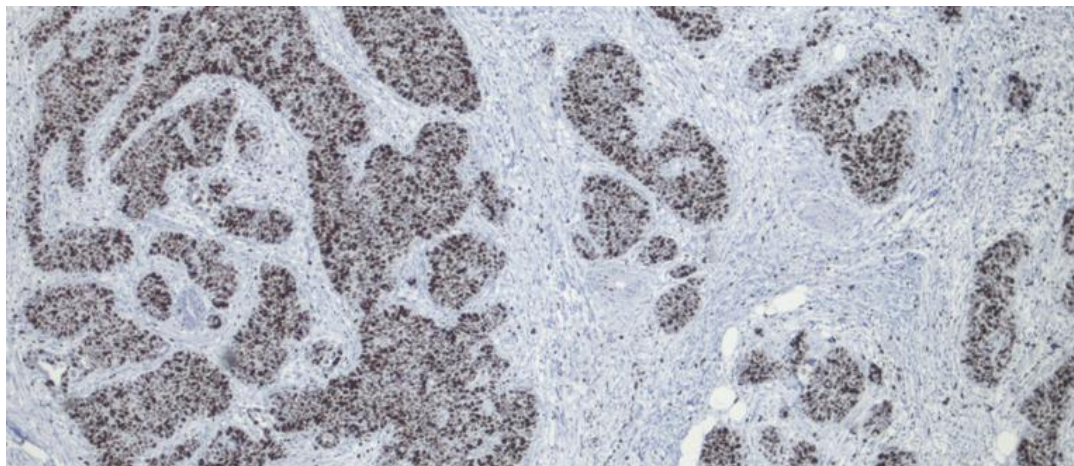


Figura 18. Imagen histológica a 40 aumentos de una biopsia de tejido de CMTN donde se aprecia un elevado patrón de tinción nuclear del antígeno Ki-67 (superior al 50%) empleando técnicas de IHQ.

Resultados

En un 21.4% de la cohorte se detectó una baja expresión de HER2 a través de IHQ (figura 19). De las 9 pacientes con baja expresión de HER2, 5 tuvieron 1+ por IHQ mientras que 4 de ellas expresaron 2+ por IHQ, pero con FISH negativo (tabla 11).

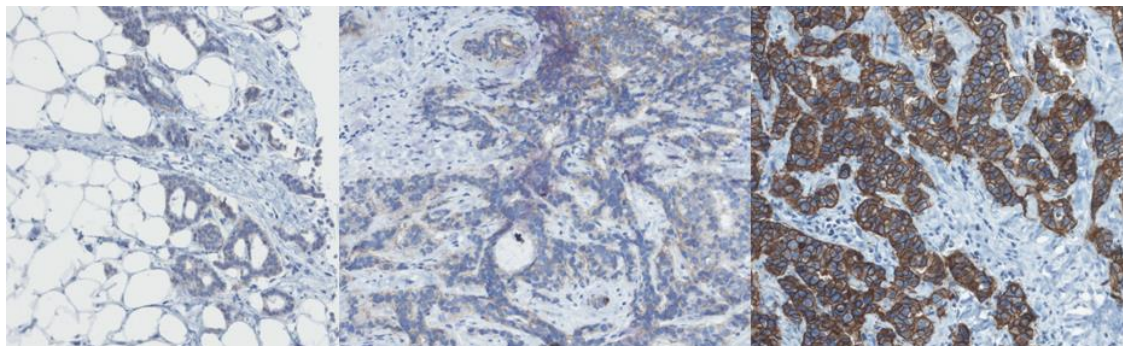


Figura 19. Comparativa de imágenes histológicas de CMTN a 200 aumentos donde se observa el patrón de tinción de membrana de HER2 mediante IHQ. De izquierda a derecha: En la primera imagen se aprecia una tinción de membrana muy débil en una proporción de células superior al 10% (HER2 1+). En la segunda imagen se puede ver una positividad de membrana de intensidad débil en más del 10% de células (HER2 2+). Por último, en la tercera imagen se observa una tinción intensa y uniforme de la membrana en la mayor parte de las células neoplásicas (HER2 3+).

La expresión de *EGFR* mediante IHQ (figura 20), considerada como positiva cuando se tiñeron más del 1% de las células tumorales, fue del 73.8% (tabla 11).

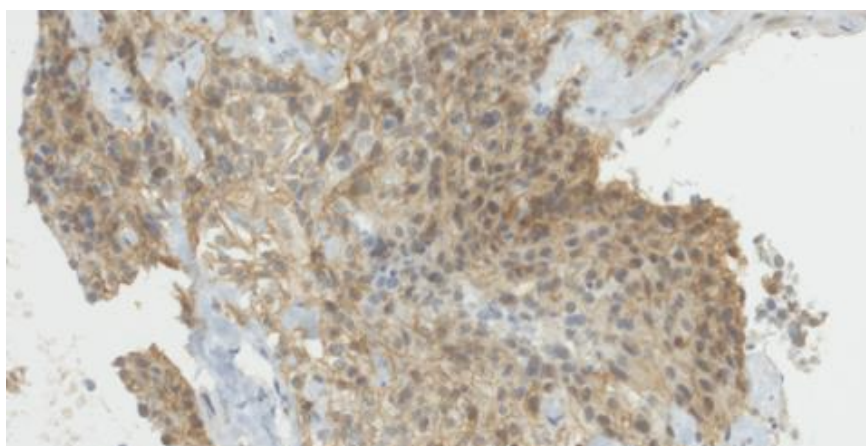


Figura 20. Imagen histológica de CMTN en 200 aumentos donde se aprecia un intenso patrón de tinción citoplasmático y de membrana para EGFR en la práctica totalidad de las células tumorales a través de técnicas de IHQ.

Resultados

Respecto a la expresión de RA, 5 de las 42 pacientes analizadas (11.9%) mostraron $\geq 1\%$ de positividad para la tinción nuclear de las células neoplásicas empleando el anticuerpo contra RA (figura 21) (tabla 11).

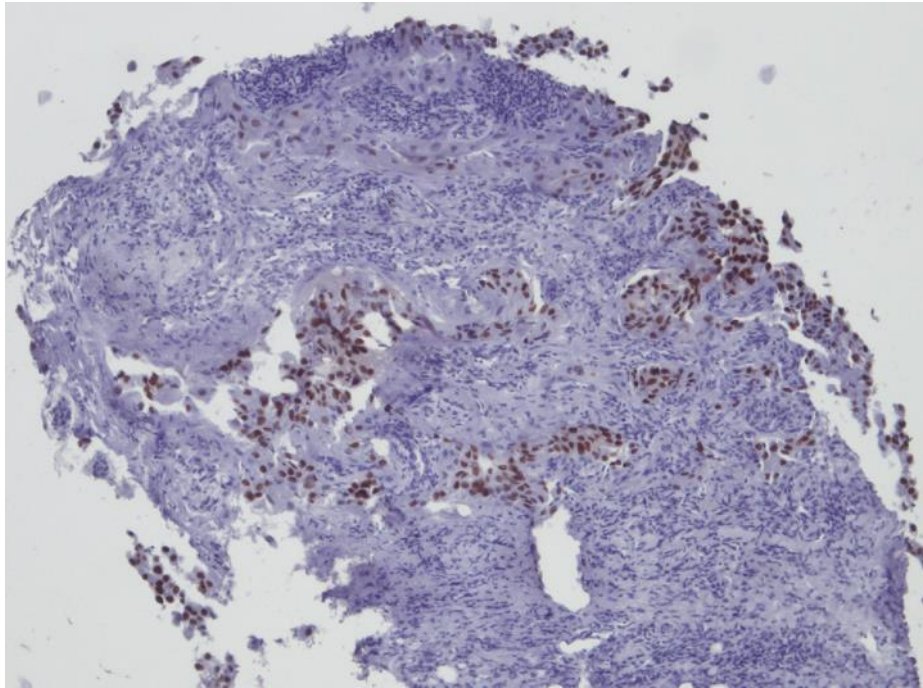


Figura 21. Imagen histológica de CMTN a 40 aumentos donde se observa la positividad de la tinción nuclear del receptor de andrógenos por IHQ en alrededor de un 30-40% de las células tumorales.

Tabla 11. Características anatomo-patológicas basales de las pacientes del estudio donde se incluyen la histología, el grado histológico, Ki-67, expresión de HER2, de EGFR y de RA.

Características anatomo-patológicas	N:42	%
Histología:		
Carcinoma ductal infiltrante	40	95.2%
Carcinoma apocrino	2	4.8%
Grado histológico:		
G1	1	2.4%
G2	11	26.2%
G3	30	71.4%
Ki-67 (media, rango)	49 [15-99]	

Expresión de HER2 (por IHQ):		
0	33	78.6%
1+	5	11.9%
2+, negativo por FISH	4	9.5%
Expresión de EGFR:		
SI	31	73.8%
NO	11	26.2%
Expresión de RA:		
0%	37	88.1%
1-10%	2	4.8%
>10%	3	7.1%

Al analizar la presencia de los TILs mediante una primera aproximación a través de hematoxilina-eosina se observó que el 47.6% de las pacientes presentaban una alta expresión de TILs (considerado como un infiltrado linfocitario superior al 30% del tejido analizado) (figura 22). La expresión media de TILs de la muestra fue del 30.7%, con una variabilidad entre las pacientes que fue del 1 al 90% (tabla 12).

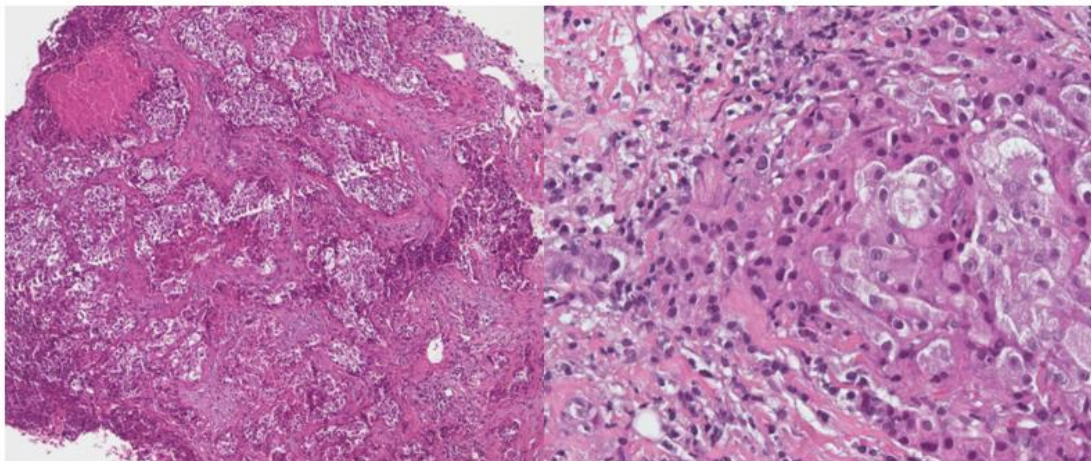


Figura 22. Imágenes histológicas de CMTN a 40 aumentos (izquierda) y 200 aumentos (derecha) donde se observa un elevado patrón de infiltración linfocitaria tumoral (superior al 30%). La hematoxilina tiñe los núcleos de las células linfocitarias en azul a púrpura y la eosina colorea otros elementos celulares en los tejidos en una tonalidad del rosa.

Asimismo, se determinó que la mayoría de los infiltrados linfocitarios se localizaban en la periferia del tumor (alrededor del 68% de los TILs [20-90%]), representado sólo un 32% los infiltrados intratumorales [10-80%]. Al analizar en mayor detalle la estirpe linfocitaria se observó que la mayoría de los linfocitos eran CD4+, representando el 70% del total de TILs con una variación que fue del 50 al 85%, mientras que solamente un 30% fueron CD8+ [15-50%] (tabla 12).

Tabla 12. Expresión media y rango de los TILs, así como las proporciones en la distribución de los TILs peri/intratumorales y CD4+/CD8+ de las pacientes con CMTN precoz.

Expresión de TILs (media, rango): 30.7% [1-90%]		
Linfocitos infiltrantes de tumor (TILs):	N:42	%
0-9%	5	11.9%
10-29%	17	40.5%
30-49%	10	23.8%
+50%	10	23.8%
Proporción de TILs peritumorales (media, rango)	68% [20-90%]	
Proporción de TILs intratumorales (media, rango)	32% [10-80%]	
Proporción de linfocitos CD4+ (media, rango)	70% [50-85%]	
Proporción de linfocitos CD8+ (media, rango)	30% [15-50%]	

5.1.3 Características de los mediadores solubles

Se analizaron 22 citoquinas a partir de las muestras sanguíneas basales extraídas antes de iniciar tratamiento con QTN. Los análisis de las citoquinas se realizaron en plasma. Dentro de los resultados obtenidos cabe destacar que los niveles más elevados detectados mediante un inmunoensayo multiparamétrico fueron sGal-3 (mediana de 3205.6 pg/ml, rango 4.23-16919.26 pg/ml), sIL-23 (mediana de 128.7 pg/ml, rango 9.67-576.78 pg/ml) y fractalquina o sCX3CL1 (mediana de 102.91 pg/ml, rango 9.56-232.98 pg/ml) como se observa en la figura 23 y la tabla 13.

Resultados

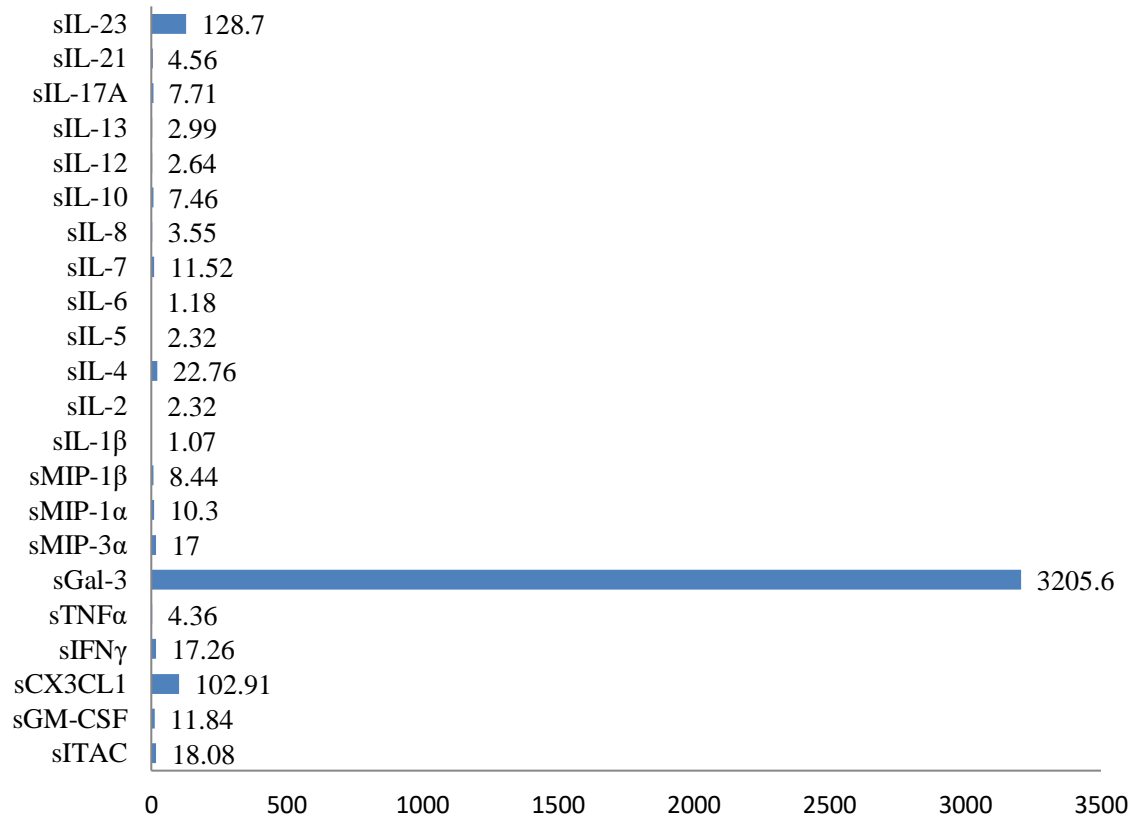


Figura 23. Representación de la mediana de cifras plasmáticas medidas en pg/ml de las diversas citoquinas analizadas, donde destacan los elevados niveles de sGal-3.

Tabla 13. Descripción de la media, la mediana y los valores mínimos y máximos de los niveles plasmáticos basales de las citoquinas analizadas.

Citoquinas solubles	Niveles plasmáticos: Media (pg/ml)	Niveles plasmáticos: Mediana (pg/ml)	Niveles plasmáticos: Rango (pg/ml)
<i>sITAC</i>	20.45	18.08	10.8-57.93
<i>sGM-CSF</i>	16.65	11.84	1.23-59.04
Fractalquina	110.25	102.91	9.56-232.98
<i>sIFNγ</i>	17.72	17.26	0.75-39.63
<i>sTNFα</i>	4.93	4.36	2.26-14.18
<i>sGal-3</i>	4143.66	3205.6	4.23-16919.26
<i>sMIP-3α</i>	17.46	17	2.17-39.90
<i>sMIP-1α</i>	10.27	10.3	2-23.65
<i>sMIP-1β</i>	10.21	8.44	2.69-32.94
<i>sIL-1β</i>	1.56	1.07	0.51-5.45
<i>sIL-2</i>	2.52	2.32	0.48-8.42

Resultados

sIL-4	30.64	22.76	1.99-191.91
sIL-5	2.81	2.32	0.52-6.25
sIL-6	1.88	1.18	0.05-17.43
sIL-7	12.04	11.52	0.84-29.87
sIL-8	4.98	3.55	1.19-27.21
sIL-10	8.27	7.46	1.1-22.12
sIL-12	2.7	2.64	0.53-6.74
sIL-13	3.74	2.99	0.27-18.77
sIL-17A	8.17	7.71	0.27-17.97
sIL-21	4.89	4.56	0.22-15.26
sIL-23	164.81	128.7	9.67-576.78

También se analizaron 17 puntos de control inmunológico en plasma a partir de las muestras de biopsia líquida extraídas previamente al inicio de la QTN. Dentro de los resultados obtenidos mediante el Elisa multiparamétrico destacaron unas cifras elevadas de sLAG-3 (mediana de 268384.2 pg/ml, rango 52323-829873 pg/ml) en comparación con el resto de analitos, como se puede observar en la figura 24 y la tabla 14.

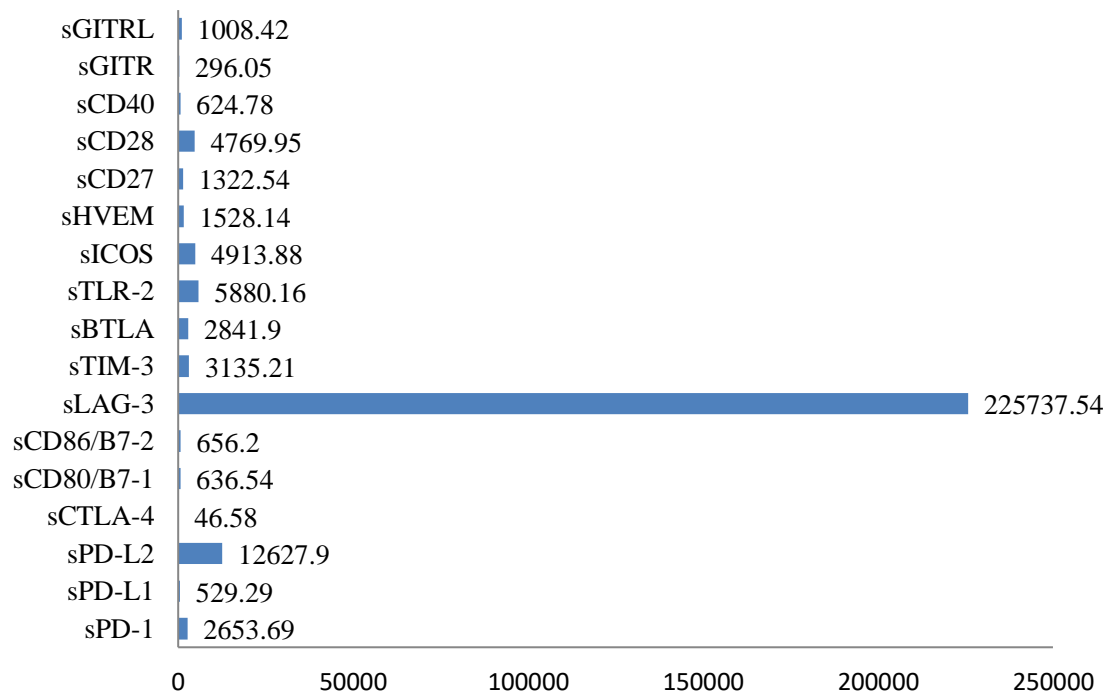


Figura 24. Representación de la mediana de cifras plasmáticas medidas en pg/ml de los puntos de control inmunológicos analizados, donde destacan los elevados niveles de sLAG-3.

Tabla 14. Descripción de la media, la mediana y los valores mínimos y máximos de los niveles plasmáticos basales de los puntos de control inmunológicos solubles analizados.

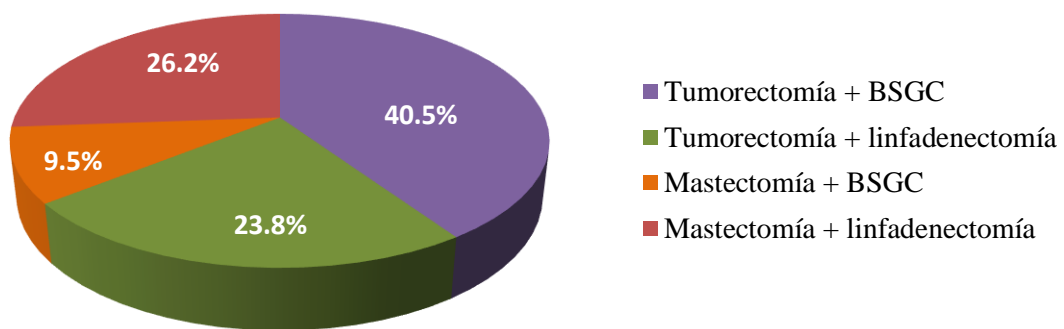
Puntos de control inmunológico solubles	Niveles plasmáticos: Media (pg/ml)	Niveles plasmáticos: Mediana (pg/ml)	Niveles plasmáticos: Rango (pg/ml)
sPD-1	3940.04	2653.69	207.74-15151.58
sPD-L1	810.23	529.29	89.9-3496.6
sPD-L2	15172.3	12627.9	3453.65-31918.71
sCTLA-4	86.37	46.58	9.89-742.34
sCD80/B7-1	897.47	636.54	96.36-2799.1
sCD86/B7-2	1248.12	656.2	73.51-11391.68
sLAG-3	268384.2	225737.54	52323.05-829873.56
sTIM-3	3261.74	3135.21	1333.46-6530.91
sBTLA	4298.39	2841.9	249.34-16536.69
sTLR-2	7307.64	5880.16	982.54-23551.58
sICOS	7306.8	4913.88	465.14-25838.97
sHVEM	1523.17	1528.14	445.68-2482.32
sCD27	1601.67	1322.54	361.98-3837.43
sCD28	8122.24	4769.95	1521.14-31225.48
sCD40	750.64	624.78	278.74-1541.22
sGITR	717.03	296.05	43.22-5127.18
sGITRL	1487.39	1008.42	190.58-5212.86

5.2 DESCRIPCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS POST-QUIRÚRGICAS DE LA COHORTE DE PACIENTES CON CMTN

La mediana de edad en el momento de la intervención quirúrgica fue de 56 años. De las 42 intervenciones practicadas, 27 pacientes fueron sometidas a una cirugía de conservación mamaria (tumorectomía o cuadrantectomía) y 15 a una mastectomía radical (tabla 15 y figura 25). Se efectuó linfadenectomía axilar completa en 21 pacientes (el 50% de la muestra) (tabla 15 y figura 25), de las cuales 20 pacientes tenían afectación ganglionar inicial, y la restante se amplió a vaciamiento axilar tras detectar más de 5000 copias/μl de CK19 mRNA en el ganglio centinela.

Tabla 15. Características de la intervención quirúrgica de las pacientes del estudio.

Características de la intervención quirúrgica	N:42	%
Edad a la cirugía (media, rango):	56 [29-78]	
Tipo de intervención quirúrgica:		
Tumorectomía + BSGC	17	40.5%
Tumorectomía + linfadenectomía axilar completa	10	23.8%
Mastectomía + BSGC	4	9.5%
Mastectomía + linfadenectomía axilar completa	11	26.2%

**Figura 25.** Porcentajes de los diferentes tipos de intervenciones quirúrgicas realizadas. La cirugía conservadora se empleó más que la mastectomía radical, y la mitad de las pacientes se sometieron a linfadenectomía.

El análisis de la pieza quirúrgica mostró un 31% de RCp y un 52.4% de respuestas parciales patológicas, localizando sólo una progresión a nivel local durante la QTN en una paciente (2.4%) (figura 26 y tabla 16).

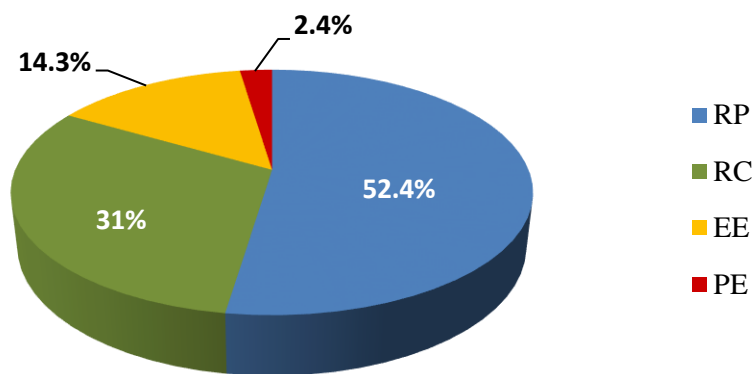


Figura 26. Tipo de respuestas patológicas a QTN en la que se puede observar que más de la mitad de las pacientes obtuvieron una respuesta parcial, casi un tercio de la cohorte tuvieron una respuesta completa patológica, mientras que menos de un quinto de las pacientes obtuvieron una enfermedad estable o progresión de enfermedad durante la neoadyuvancia.

La RCp a nivel local (G5) fue del 40.5%, observándose buenas respuestas locales a la neoadyuvancia (G3 y G4) en el 28.6%. Respecto a la respuesta patológica a nivel ganglionar, en la mayoría (38.1%) se detectaron ganglios linfáticos negativos, sin cambios atribuibles a quimioterapia (A), seguido de ganglios linfáticos negativos con cambios postquimioterapia (D) en un 33.3%. La afectación ganglionar tras la QTN (B y C) se observó 28.6% de los casos (tabla 16).

La mayor parte de las pacientes recibió RT adyuvante (90.5%), administrándose sólo al 28.6% de ellas QT adyuvante con capecitabina (tabla 16). El hecho de que tan sólo 1 de cada 3 recibiera QT adyuvante, probablemente es debido a que esta terapia no tuvo datos de beneficio hasta finales del año 2017, no representando un estándar terapéutico hasta entonces.

Hasta el punto de corte del seguimiento de las pacientes (noviembre 2022, mediana de seguimiento de 68.5 meses) se detectaron un total de 13 recaídas de enfermedad (31% del total) (tabla 16). La localización más frecuente de la recaída fue a nivel pulmonar (7/13), seguida de la afectación ganglionar (5/13), hepática (4/13), ósea (4/13), local (3/13) y cerebral (3/13).

Se produjeron 10 fallecimientos, lo que representa el 23.8% de las pacientes incluidas en el estudio (tabla 16). En todos los casos la causa del exitus fue la propia enfermedad tumoral.

Tabla 16. Características post-quirúrgicas de las pacientes, donde se incluyen el tipo de respuesta patológica (tanto a nivel general, como local y ganglionar) medida por el sistema de Miller y Payne, las terapias adyuvantes administradas, tasa de recaída de enfermedad y éxitus.

Características post-quirúrgicas	N:42	%
Respuesta patológica:		
Respuesta completa	13	31%
Respuesta parcial	22	52.4%
No respuesta / Estabilidad	6	14.3%
Progresión de enfermedad	1	2.4%
Respuesta patológica local por Miller y Payne:		
G1	6	14.3%
G2	7	16.7%
G3	6	14.3%
G4	6	14.3%
G5	17	40.5%
Respuesta patológica ganglionar por Miller y Payne:		
A	16	38.1%
B	5	11.9%
C	7	16.7%
D	14	33.3%
Radioterapia adyuvante:		
SI	38	90.5%
NO	4	9.5%
Quimioterapia adyuvante:		
SI	12	28.6%
NO	30	71.4%
Recaída:		
SI	13	31%
NO	29	69%
Éxitus		
SI	10	23.8%
NO	32	76.2%

5.3 ANÁLISIS DE CORRELACIÓN ENTRE VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS Y ANALITOS

- **Tamaño del tumor primario:** Al analizar la posible correlación entre las variables histológicas y los mediadores solubles con el tamaño tumoral previo al inicio del tratamiento, se observó que los tumores con un tamaño superior a 5cm ($\geq T3$) presentaron mayores niveles de sGal-3 (>3205.6 pg/ml, p -valor 0.049), sMIP-3 α (>17 pg/ml, p -valor 0.028) y sIL-8 (>3.55 pg/ml, p -valor 0.02) respecto a los tumores con un tamaño inferior a 5cm (figura 27).

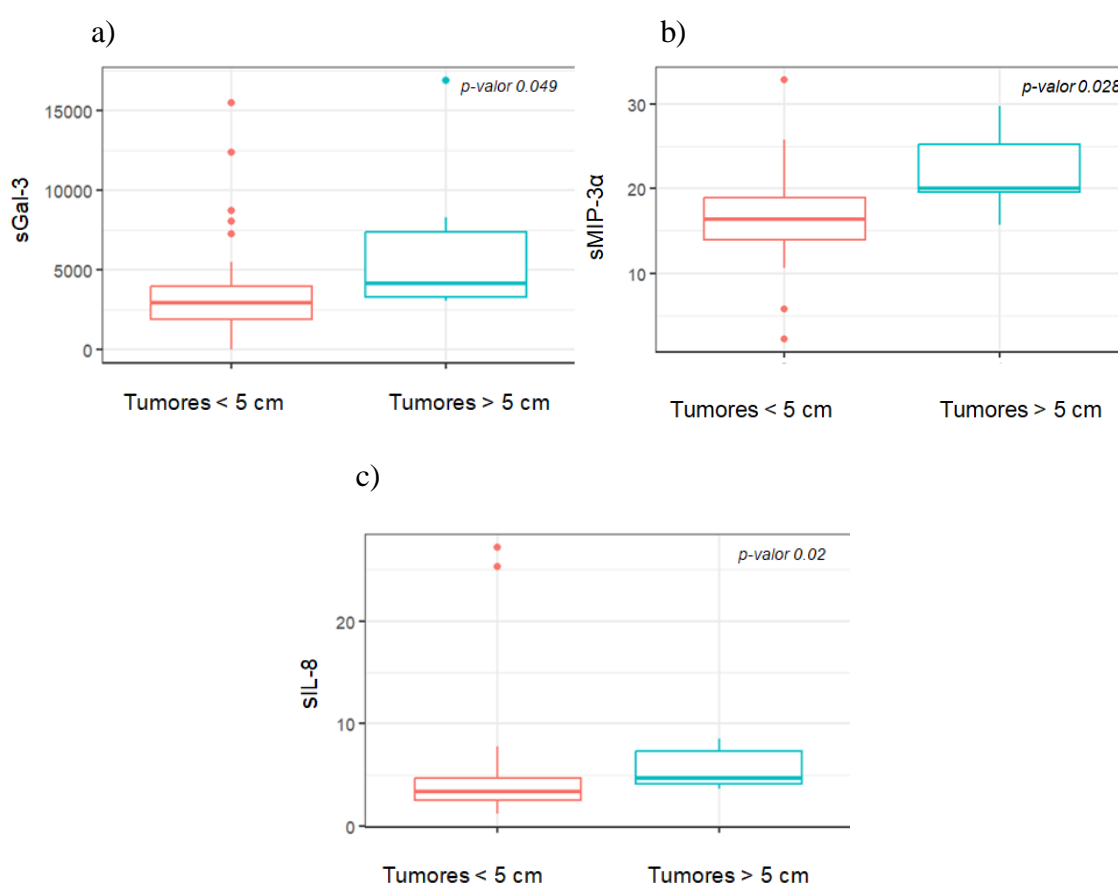


Figura 27. Gráfica de los niveles plasmáticos de sGal-3(a), sMIP-3 α (b) y sIL-8 (c) en función del tamaño tumoral (inferior a 5 cm vs. superior a 5cm). El color rosa representa a los tumores inferiores a 5 cm y coincide con las pacientes con niveles más bajos; mientras que el color azul representa a las pacientes con tumores superiores a 5 cm y poseen niveles más elevados de los analitos solubles expuestos. La línea central representa la mediana. P valor obtenido en la prueba U de Mann-Whitney.

Resultados

Además, como se puede observar en la figura 28, se ha relacionado un aumento de los niveles plasmáticos de sMIP-1 α (>10.3 pg/ml, p -valor 0.024), sPD-1 (>2653.69 pg/ml, p -valor 0.044), sLAG-3 (>225737.54 pg/ml, p -valor 0.035), sTIM-3 (>3135.21 pg/ml, p -valor 0.22) y sBTLA (>2841.9 pg/ml, p -valor 0.022) con tumores con un tamaño superior a 2 cm ($\geq T2$).

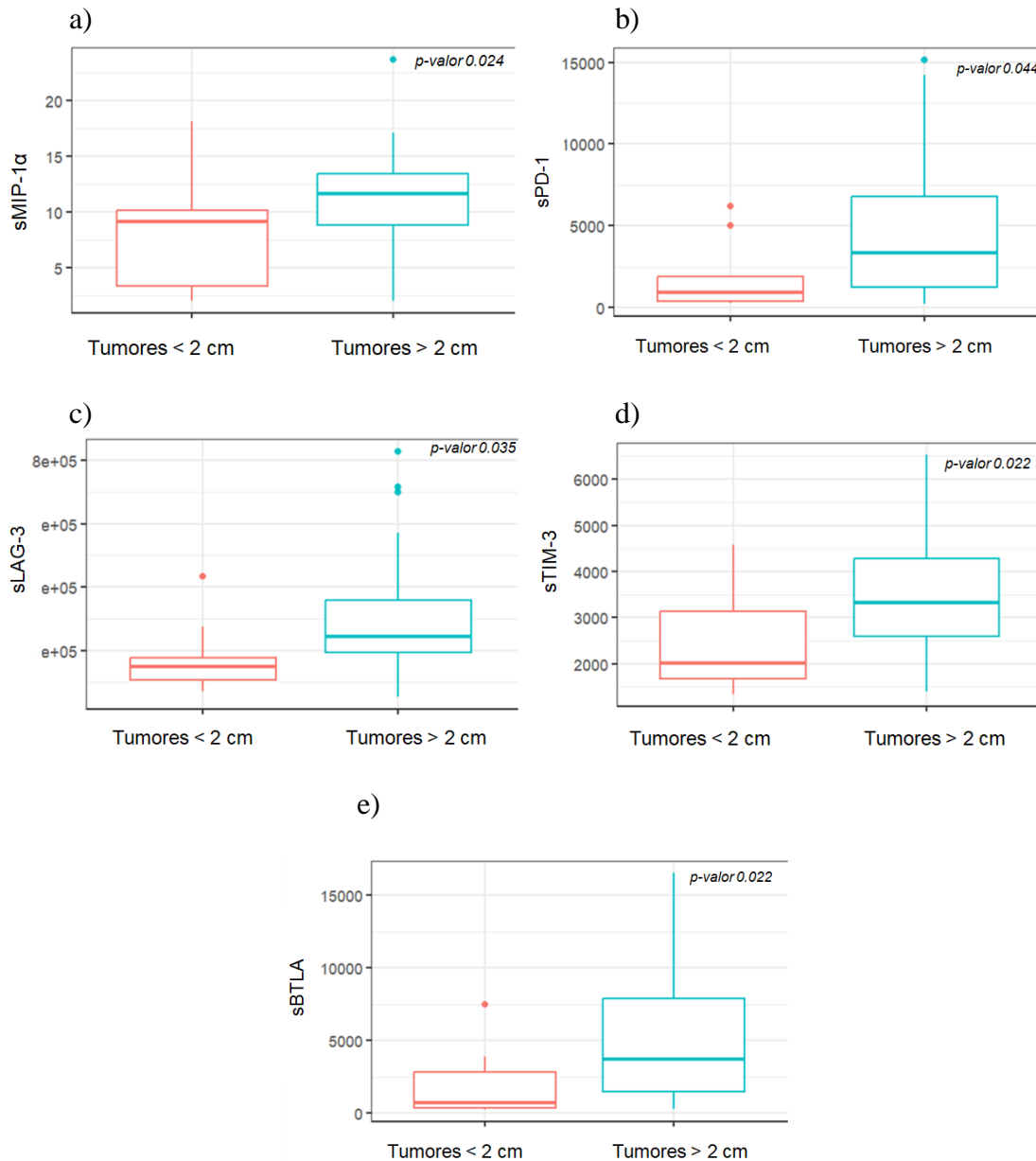


Figura 28. Gráfica de los niveles plasmáticos de sMIP-1 α (a), sPD-1 (b), sLAG-3 (c), sTIM-3 (d) y sBTLA (e) en función del tamaño tumoral (inferior a 2 cm vs. superior a 2cm). El color rosa representa a las pacientes con tumores inferiores a 2 cm que coinciden con niveles más bajos de los analitos analizados; mientras que el color azul representa a las pacientes con tumores mayores de 2 cm y que poseen niveles más elevados de los analitos en plasma. La línea central representa la mediana. P valor obtenido en la prueba U de Mann-Whitney.

- **Afectación ganglionar:** Las pacientes con afectación adenopática inicial presentaron de manera significativa mayores niveles de sTNF α (>4.36 pg/ml, p -valor 0.004) y sGal-3 (3205.6 pg/ml, p -valor 0.01) (figura 29). Esta asociación fue más evidente con sGal-3, ya que a un mayor número de ganglios afectados se encontraron niveles plasmáticos más elevados de sGal-3 (figura 29c).

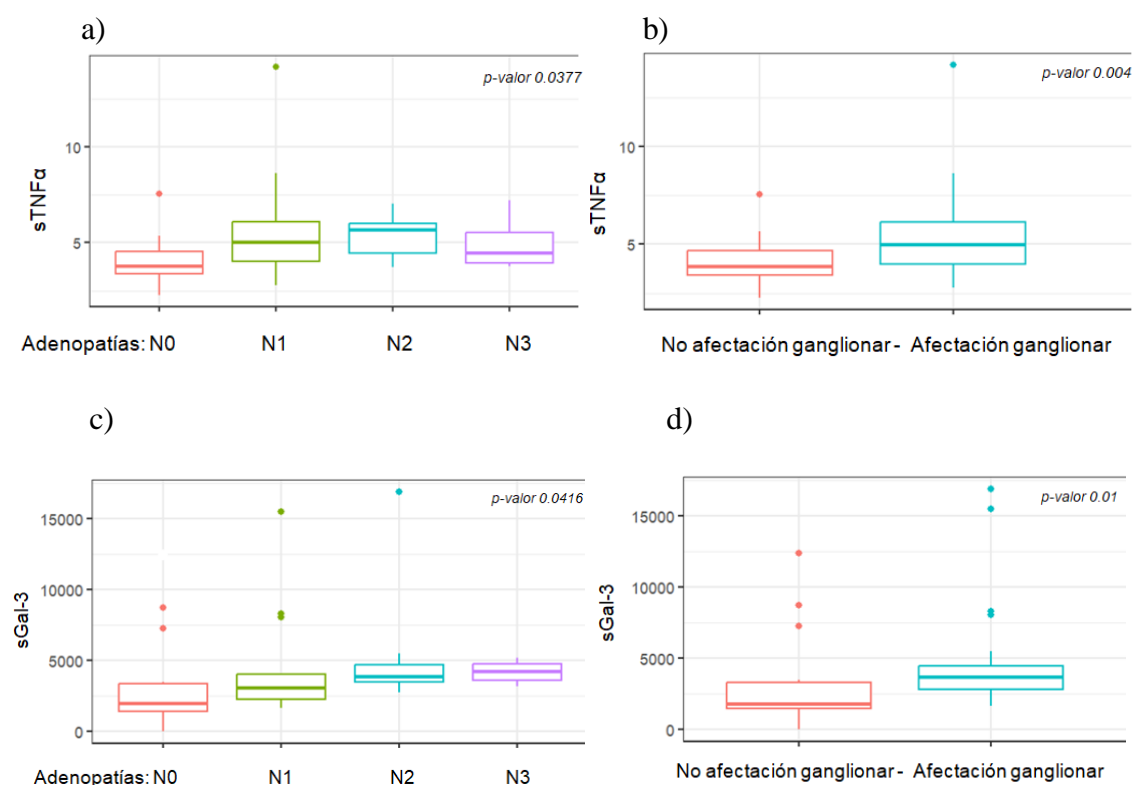


Figura 29. Gráfica de los niveles plasmáticos de sTNF α (a-b) y sGal-3 (c-d) en función de la afectación ganglionar. En las gráficas de la izquierda se simbolizan los niveles plasmáticos de N0 (rosa), N1 (verde), N2 (azul) y N3 (morado). En las gráficas de la derecha el color rosa representan los niveles de sTNF α y sGal-3 de las pacientes sin afectación ganglionar, mientras que el color azul representa a las pacientes con afectación ganglionar. La línea central representa la mediana. P valor obtenido en la prueba U de Mann-Whitney.

- **Estadio tumoral clínico:** En el análisis de correlación del estadio tumoral con los analitos estudiados, se observó que las pacientes con tumores localmente avanzados (estadios III) presentaron niveles plasmáticos más bajos de sITAC (<18.08 pg/ml, p -valor 0.006) vs. tumores localizados (estadios I y II) (figura 30), siendo sITAC el único de los mediadores solubles estudiados que a un mayor estadio mostró unos menores niveles en plasma.

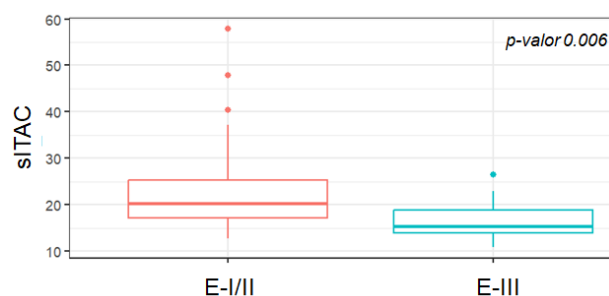


Figura 30. Gráfica de los niveles de sITAC en función de tumores localizados vs. localmente avanzados. El color rosa simboliza a las pacientes con tumores estadio I y II, mientras que el color azul representa a las pacientes con tumores estadio III. La línea central representa la mediana. P valor obtenido en la prueba U de Mann-Whitney.

Sin embargo, mayores niveles de sGal-3 (>3205.6 pg/ml, *p*-valor 0.013), sIL-8 (>3.55 pg/ml, *p*-valor 0.02), sPD1 (>2653.69 pg/ml, *p*-valor 0.012), sCTLA-4 (>46.58 pg/ml, *p*-valor 0.042), sCD80/B7-1 (>636.54 pg/ml, *p*-valor 0.032), sTIM-3 (>3135.21 pg/ml, *p*-valor 0.005), sBTLA (>2841.9 pg/ml, *p*-valor 0.007), sTLR-2 (>5880.16 pg/ml, *p*-valor 0.034), sICOS (>4913.88 pg/ml, *p*-valor 0.004), sCD27 (>1322.54 pg/ml, *p*-valor 0.044), sCD28 (>4769.95 pg/ml, *p*-valor 0.007) y sGITRL (>1008.42 pg/ml, *p*-valor 0.03) se han relacionado con estadios localmente avanzados (estadios IIIB y IIIC) vs. estadios localizados (estadios I y II) (figuras 31 y 32). Al igual que ocurrió con la afectación ganglionar, y como se puede apreciar en la figura 31a, la asociación fue más evidente con sGal-3, ya que a un mayor estadio clínico se obtuvieron mayores niveles de sGal-3.

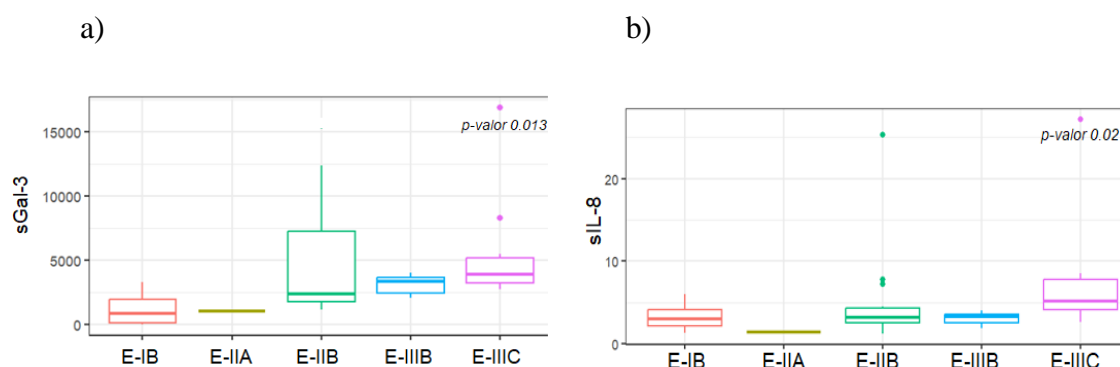
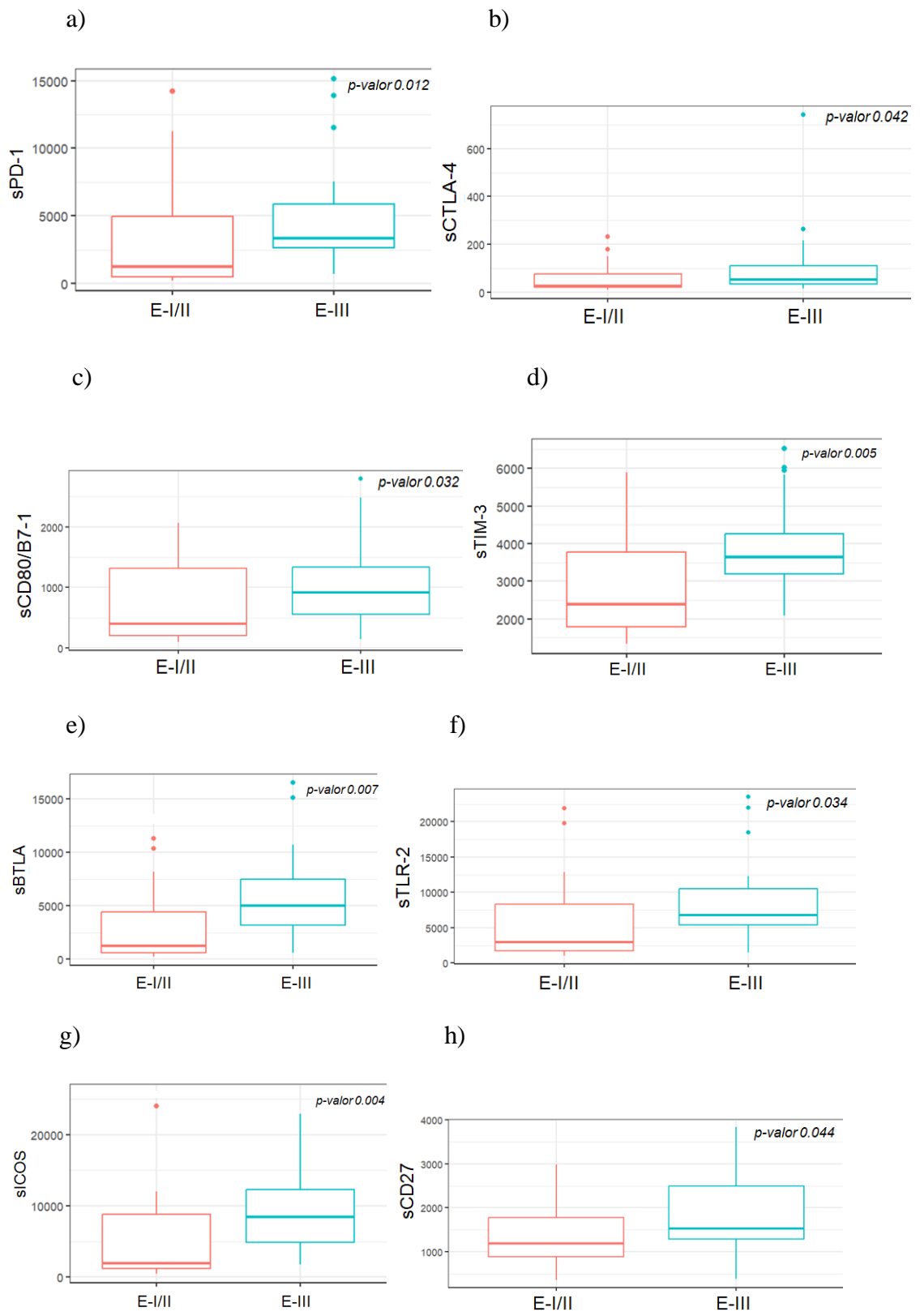


Figura 31. Gráfica de los niveles de sGal-3(a) y sIL-8 (b) en función del estadio tumoral. Se representan los niveles plasmáticos de E-IB (rosa), E-IIA (verde oliva), E-IIB (verde claro), E-IIIB (azul) y E-IIIC (morado). La línea central representa la mediana. P valor obtenido en la prueba H de Kruskal Wallis.



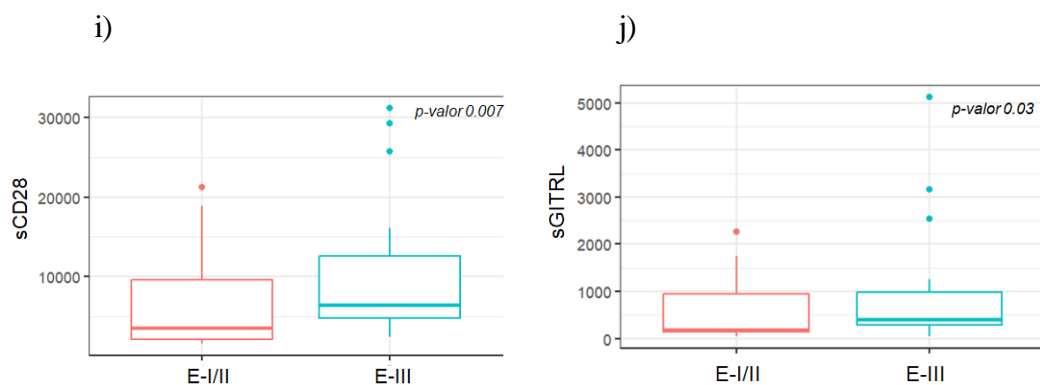


Figura 32. Gráfica de los niveles de *sPD-1* (a), *sCTLA-4* (b), *sCD80/B7-1* (c), *sTIM-3* (d), *sBTLA* (e), *sTLR-2* (f), *sICOS* (g), *sCD27* (h), *sCD28* (i) y *sGITRL* (j) en función de tumores localizados vs. localmente avanzados. El color rosa representa a las pacientes con tumores estadio I y II, mientras que el color azul representa a las pacientes con tumores estadio III. La línea central representa la mediana. P valor obtenido en la prueba U de Mann-Whitney.

- **BRCA1/2:** En las 23 pacientes a las que se les realizó la detección de *BRCA1/2* a nivel germinal, se efectuó un subanálisis de correlación donde se encontraron menores niveles de *sTNFα* (<4.36 pg/ml, *p*-valor 0.02) pero mayores niveles plasmáticos de *sIL-2* (>2.32 pg/ml, *p*-valor 0.018) en las mujeres con mutación en *BRCA1/2* en comparación con las pacientes no mutadas como se muestra en la figura 33.

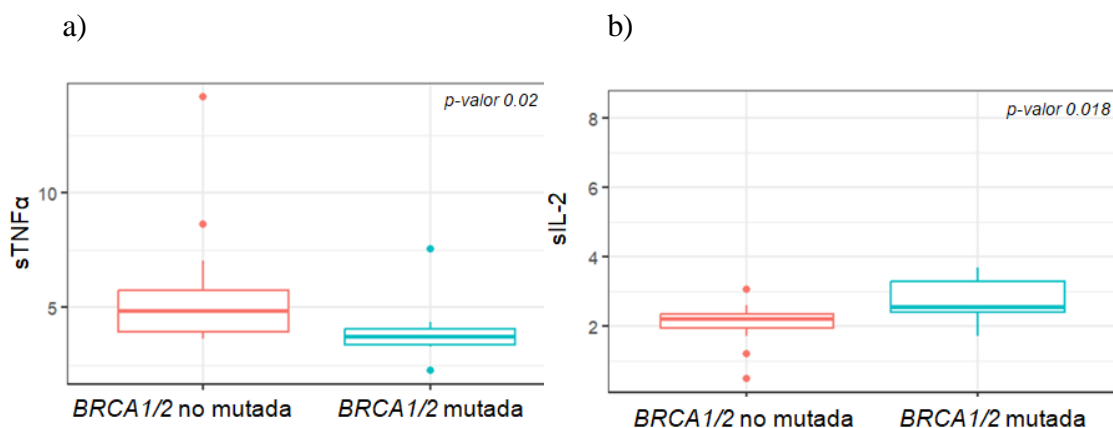


Figura 33. Gráfica de los niveles de *sTNFα* (a) y *sIL-2* (b) según el estado mutacional de *BRCA1/2*. El color rosa representa las pacientes sin mutación a nivel germinal de *BRCA1/2*, mientras que el color azul representa a las pacientes mutadas. La línea central representa la mediana. P valor obtenido en la prueba U de Mann-Whitney.

- **Tipo de QT:** De los diversas terapias empleadas, las pacientes que recibieron QTN basada en taxanos y platinos (en donde se incluyeron tanto las pacientes con el esquema

de antraciclinas y ciclofosfamida seguido de paclitaxel y carboplatino, como las pacientes con docetaxel y carboplatino) obtuvieron unas mejores tasas de respuestas objetivas (*p*-valor 0.002) tanto a nivel local como ganglionar, y mayores tasas de RCp (58.83% vs. 12%, *p*-valor 0.002) en comparación con aquellas pacientes en las que no se administró carboplatino dentro de la QTN (en donde se incluyó tanto el esquema de antraciclinas y ciclofosfamida seguido de paclitaxel, como el de docetaxel y ciclofosfamida).

- Respuesta patológica a la QTN: Para correlacionar las variables histológicas y los analitos solubles con la respuesta patológica al tratamiento con QTN, los valores de los diferentes analitos fueron dicotomizados de acuerdo con la mediana en grupos “alto” (> mediana) o “bajo” (< mediana). Los resultados muestran que los niveles elevados de sGM-CSF (>11.84 pg/ml) fueron predictivos de una menor respuesta a la QTN (*p*-valor 0.02); destacando que todas las pacientes con cifras inferiores a 11.84 pg/ml tuvieron respuesta parcial o completa, mientras que las 7 pacientes en las cuales no hubo respuesta a la QTN presentaron cifras de sGM-CSF superiores a 11.84 pg/ml (tabla 17).

Tabla 17. Tipo de respuestas patológicas a quimioterapia en función de los niveles plasmáticos de sGM-CSF. Valores de analitos solubles dicotomizados según la mediana. *P* valor obtenido en la prueba de chi-cuadrado (X^2).

Respuesta patológica	<11.84 pg/ml sGM-CSF	>11.84 pg/ml sGM-CSF	<i>p</i> -valor
RC + RP (N=35)	21	14	0.02
No respuesta (N=7)	0	7	

Sin embargo, al contrario de lo que sucedió con sGM-CSF, altas cifras de sCD86 (>656.2 pg/ml) fueron predictivas de una mejor respuesta a la QTN (*p*-valor 0.02), presentando 6 de las 7 pacientes que no consiguieron una respuesta patológica unos niveles inferiores a 656.2 pg/ml (tabla 18).

Tabla 18. Tipo de respuestas patológicas a quimioterapia en función de los niveles plasmáticos de sCD86. Valores de analitos solubles dicotomizados según la mediana. P valor obtenido en la prueba de chi-cuadrado (X^2).

Respuesta patológica	<656.2 pg/ml sCD86	>656.2 pg/ml sCD86	p-valor
RC + RP (N=35)	15	20	0.02
No respuesta (N=7)	6	1	

Además, también se examinó la respuesta patológica a nivel ganglionar, observándose que los niveles altos de sGal-3 (>3205.6 pg/ml, *p-valor* 0.03) fueron predictivos de una menor respuesta a nivel ganglionar, presentando 10 de las 12 pacientes con afectación ganglionar tras la QTN cifras basales de sGal-3 superiores a 3205.6 pg/ml (tabla 19).

Tabla 19. Tipo de respuestas patológicas a nivel ganglionar a quimioterapia en función de los niveles plasmáticos de sGal-3. Valores de analitos solubles dicotomizados según la mediana. P valor obtenido en la prueba de chi-cuadrado (X^2).

Respuesta ganglionar	<3205.6 pg/ml sGal-3	>3205.6 pg/ml sGal-3	p-valor
No afectación (N=30)	19	11	0.03
Afectación (N=12)	2	10	

No obstante, al contrario de lo que ocurrió con sGal-3, se detectaron cantidades inferiores de sITAC (<18.08 pg/ml, *p-valor* 0.02) en pacientes con mayor afectación adenopática. En 9 de las 12 pacientes con ganglios afectados tras la QTN, los niveles basales de sITAC fueron inferiores a 18.08 pg/ml, presentándose sITAC como un biomarcador predictivo de respuesta a nivel ganglionar (tabla 20).

Tabla 20. Tipo de respuestas patológicas a nivel ganglionar a quimioterapia en función de los niveles plasmáticos de sITAC. Valores de analitos solubles dicotomizados según la mediana. P valor obtenido en la prueba de chi-cuadrado (X^2).

Respuesta ganglionar	<18.08 pg/ml sITAC	>18.08 pg/ml sITAC	p-valor
No afectación (N=30)	12	18	0.02
Afectación (N=12)	9	3	

- **Grado histológico:** Los tumores pobremente diferenciados (G3) se correlacionaron con un importante aumento de cifras de sPD-L2 (>12627.9 pg/ml, p -valor 0.039) comparados con tumores bien (G1) o moderadamente diferenciados (G2) (figura 34).

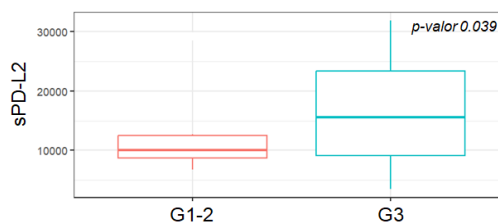


Figura 34. Gráfica de las cifras de sPD-L2 en función del grado histológico. El color rosa representa los tumores G1 y G2, mientras que el color azul representa los tumores G3. La línea central representa la mediana. P valor obtenido en la prueba U de Mann-Whitney.

- **Ki-67:** Referente al índice de proliferación Ki-67 medido por IHQ, se detectó que una expresión del antígeno Ki-67 $\geq 50\%$ se asoció con mayores niveles de sGM-CSF (>11.84 pg/ml, p -valor 0.034), sIL-1 β (>8.44 pg/ml, p -valor 0.008) e sIL-23 (>128.7 pg/ml, p -valor 0.006) (figura 35).

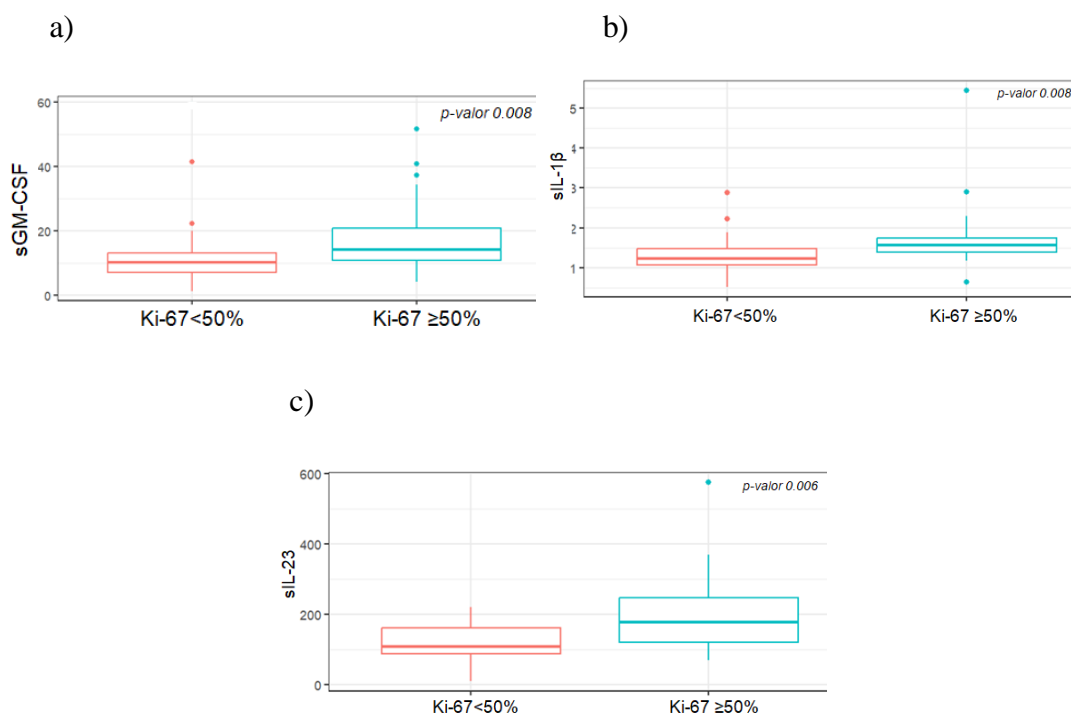


Figura 35. Gráfica de los niveles de sGM-CSF (a), sIL-1 β (b) y sIL-23(c) según la expresión de Ki-67 (<50% vs. $\geq 50\%$). El color rosa representa a las pacientes con tumores con expresión de Ki67 inferior al 50%, mientras que el color azul representa a las pacientes con tumores con una expresión de Ki67 igual o superior al 50%. La línea central representa la mediana. P valor obtenido en la prueba U de Mann-Whitney.

- **Baja expresión del Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2 low):** En el estudio de correlación de la expresión de HER2 mediante IHQ con los distintos analitos, se percibieron mayores niveles en plasma de sPD-L2 (>12627.9 pg/ml, p -valor 0.0016) y sTIM-3 (>3135.21 pg/ml, p -valor 0.022) en las pacientes con baja expresión de HER2 (HER2 1+ por IHQ y HER2 2+ por IHQ, pero con FISH no amplificado) comparadas con las pacientes que eran HER2 negativo (HER2 null o cero) (figura 36).

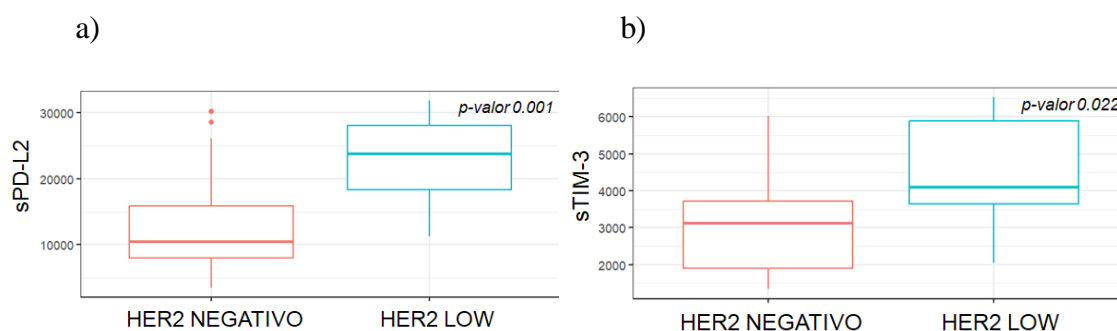


Figura 36. Gráfica de la expresión de sPD-L2 (a) y sTIM-3(b) según la expresión de HER2 (0 vs. low). El color rosa representa a las pacientes con tumores HER2 negativo o cero, mientras que el color azul representa a las pacientes con baja expresión de HER2 (HER2 1+ y HER2 2+ por IHQ con FISH no amplificado). La línea central representa la mediana. P valor obtenido en la prueba U de Mann-Whitney.

- **Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR):** La positividad para EGFR, considerada como más del 1% de tinción citoplasmática o de membrana de las células tumorales por IHQ, se asoció con mayores niveles de sIL-7 (>11.52 pg/ml, p -valor 0.046) (figura 37).

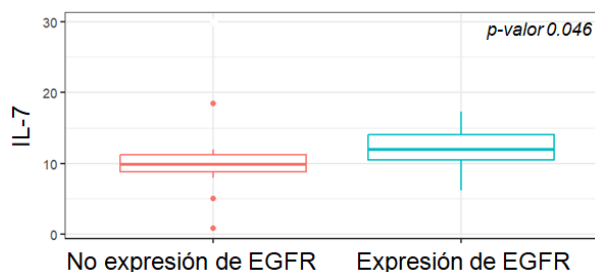


Figura 37. Gráfica de los niveles de sIL-7 según la expresión de EGFR (negativo vs. positivo). El color rosa representa a las pacientes con tumores sin expresión de EGFR, mientras que el color azul representa a las pacientes con expresión positiva de EGFR por IHQ. La línea central representa la mediana. P valor obtenido en la prueba U de Mann-Whitney.

- **Receptor de andrógenos (RA):** A pesar de un exhaustivo análisis, la expresión de receptores de andrógenos no se ha correlacionado con ninguna de las variables estudiadas en este trabajo.

- **Linfocitos infiltrantes de tumor (TILs):** Una elevada expresión de TILs, considerada como un 30% o más de la biopsia tumoral ocupada por linfocitos, se correlacionó con menores cifras plasmáticas de sIL-6 (<1.18 pg/ml, *p*-valor 0.016) (figura 38).

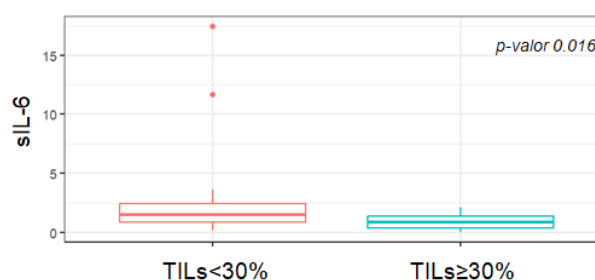


Figura 38. Gráfica de las cifras de sIL-6 en función de la expresión de TILs (<30% vs. ≥30%). El color rosa simboliza los niveles de sIL-6 en pacientes con una expresión de TILs inferior al 30%, mientras que el color azul representa dichos niveles en pacientes con una expresión de TILs igual o superior al 30%. La línea central representa la mediana. *P* valor obtenido en la prueba *U* de Mann-Whitney.

Un aumento en la proporción de linfocitos peritumorales con respecto a los linfocitos intratumorales se ha correlacionado con varios puntos de control inmunológico solubles asociados a peores características clínicas como son: sPD-1 (>2653.69 pg/ml, *p*-valor 0.031), sCTLA-4 (>46.58 pg/ml, *p*-valor 0.023), sCD80/B7-1 (>636.54 pg/ml, *p*-valor 0.03), sCD86/B7-2 (>656.2 pg/ml, *p*-valor 0.001), sLAG-3 (>225737.54 pg/ml, *p*-valor 0.007), sBTLA (>2841.9 pg/ml, *p*-valor 0.03), sTLR-2 (>5880.16 pg/ml, *p*-valor 0.014), sCD28 (>4769.95 pg/ml, *p*-valor 0.023) y sGITRL (>1008.42 pg/ml, *p*-valor 0.014).

Por otra parte, una mayor proporción de linfocitos CD4+ respecto a CD8+ se ha asociado con menores cifras plasmáticas de algunos puntos de control inmunológico como son: sPD-1 (<2653.69 pg/ml, *p*-valor 0.006), sPD-L1 (<529.29 pg/ml, *p*-valor 0.012), sPD-L2 (<12627.9 pg/ml, *p*-valor 0.043), sCTLA-4 (<46.58 pg/ml, *p*-valor 0.003), sCD80/B7-1 (<636.54 pg/ml, *p*-valor 0.006), sTIM-3 (<3135.21 pg/ml, *p*-valor 0.012), sBTLA (<2841.9 pg/ml, *p*-valor 0.012), sTLR-2 (<5880.16 pg/ml, *p*-valor

0.017), sCD27 (<1322.54 pg/ml, *p*-valor 0.012), sCD28 (<4769.95 pg/ml, *p*-valor 0.004), sGITR (<*p*-valor 0.012) y sGITRL (<1008.42 pg/ml, *p*-valor 0.008).

5.4 ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA (SUPERVIVENCIA LIBRE DE RECAÍDA Y SUPERVIVENCIA GLOBAL)

5.4.1 Análisis de supervivencia de las variables clínico-patológicas

- **Tamaño del tumor primario:** En los análisis de supervivencia se observó que un mayor tamaño del tumor primario de 2 cm o superior ($\geq T2$), se relacionó con una peor SLR (*p*-valor 0.049) y con una menor SG (32 meses vs. no alcanzado, *p*-valor 0.047) (figura 39).

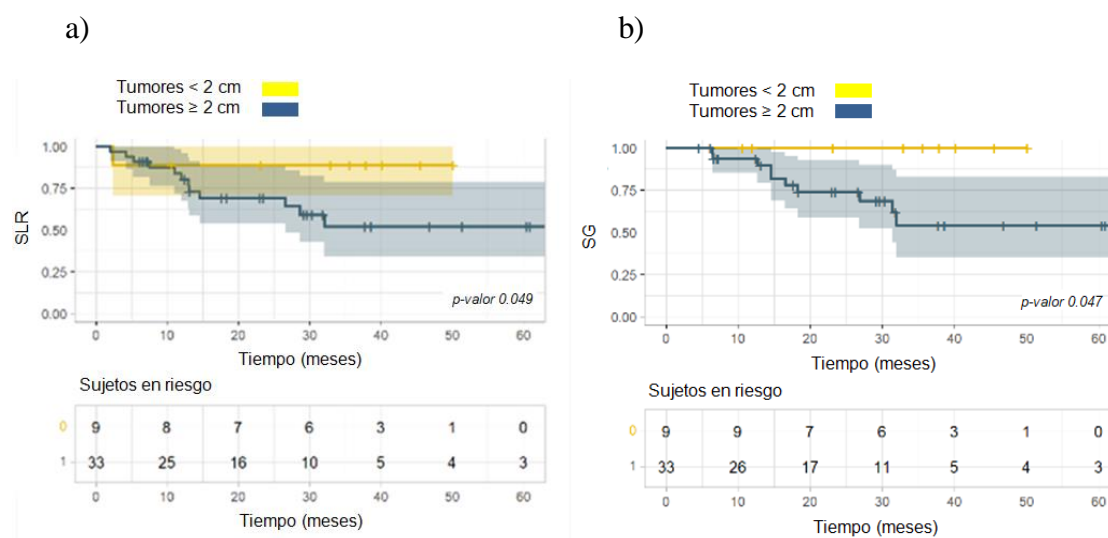


Figura 39. Curva de Kaplan-Meier para supervivencia libre de recaída (SLR) y supervivencia global (SG) en función del tamaño tumoral (tumores < 2 cm vs tumores ≥ 2 cm). a) SLR. b) SG.

La línea amarilla simboliza a los tumores menores de 2 cm, mientras que la línea azul representa a los tumores iguales o mayores a 2 cm. P valores obtenidos en el test de log-rango.

- **Afectación ganglionar:** Las pacientes en las que se detectó una afectación ganglionar clínica al inicio del diagnóstico, tuvieron una peor SLR (*p*-valor 0.017) y una menor SG (27 meses vs. mediana no alcanzada, *p*-valor 0.0003) respecto a las pacientes que debutaron sin adenopatías patológicas (figuras 40 y 41). Además, como se aprecia en la figura 41, al presentar una mayor afectación ganglionar (N2 y N3) se produjeron recaídas más precoces y una peor supervivencia.

Resultados

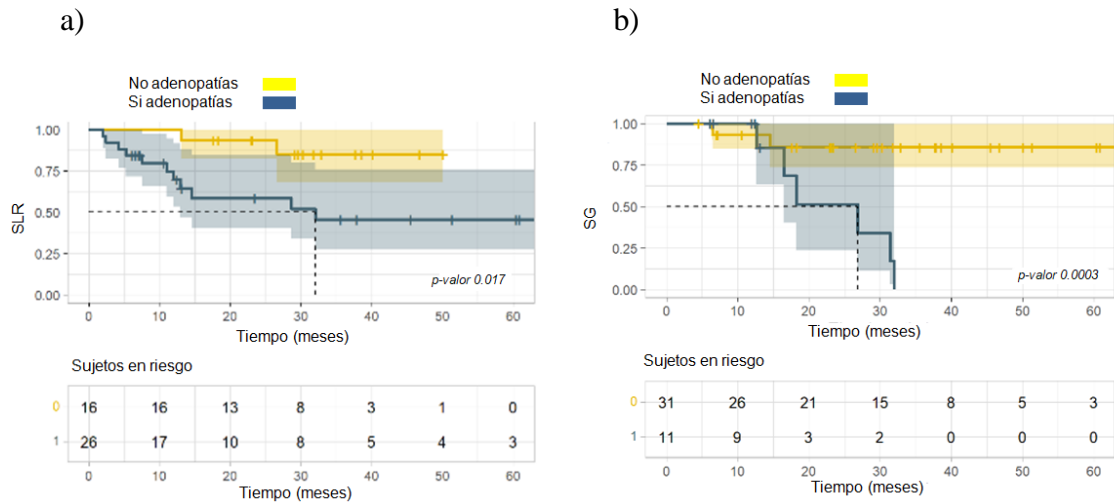


Figura 40. Curva de Kaplan-Meier para supervivencia libre de recaída (SLR) y supervivencia global (SG) en función de la afectación ganglionar. a) SLR. b) SG. La línea amarilla simboliza a las pacientes sin afectación ganglionar al diagnóstico, mientras que la línea azul representa a las pacientes con afectación adenopática. P valores obtenidos en el test de log-rango.

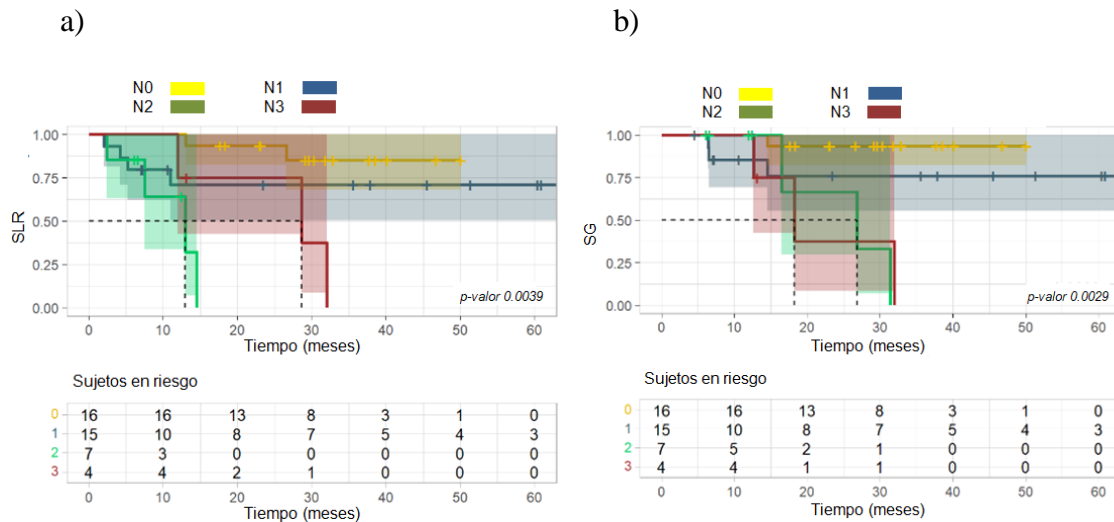


Figura 41. Curva de Kaplan-Meier para supervivencia libre de recaída (SLR) y supervivencia global (SG) en función de la afectación ganglionar (N0, N1, N2, N3). a) SLR. b) SG. La línea amarilla simboliza a las pacientes N0, la azul a las N1, la verde a las N2 y el rojo a las pacientes con afectación ganglionar N3. P valores obtenidos en el test de log-rango.

- **Estadio tumoral clínico:** Los análisis de supervivencia mostraron que un mayor estadio clínico según la 8ª edición AJCC, se relacionó con una menor SLR ($p\text{-valor } 0.0034$) y una peor SG (32 meses vs. mediana no alcanzada, $p\text{-valor } 0.0047$) (figura 42). Nuevamente, al igual que sucedía con la afectación ganglionar, las pacientes con un estadio clínico más elevado, tuvieron un peor pronóstico tanto de SLR ($p\text{-valor } 0.04$)

Resultados

como de SG (p -valor 0.028), especialmente los E-IIIB y E-IIIC (en el cual la mediana de SG no alcanzó los 26.5 meses) (figura 43).

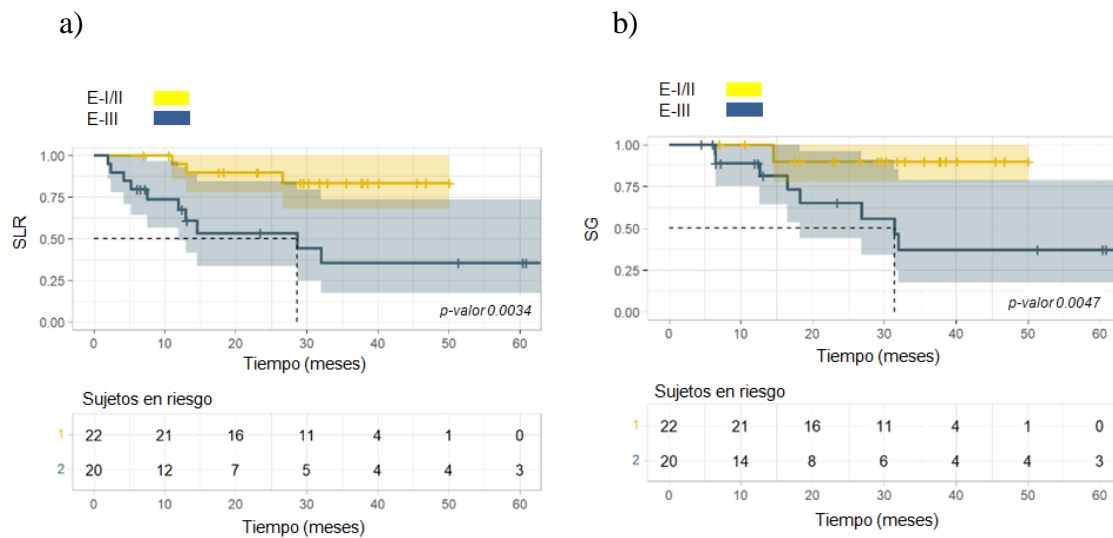


Figura 42. Curva de Kaplan-Meier para supervivencia libre de recaída (SLR) y supervivencia global (SG) en función del estadio clínico (E-I y II vs. E-III). a) SLR. b) SG. La línea amarilla simboliza a las pacientes con estadios I y II, mientras que la línea azul representa a las pacientes con estadio III. P valores obtenidos en el test de log-rango.

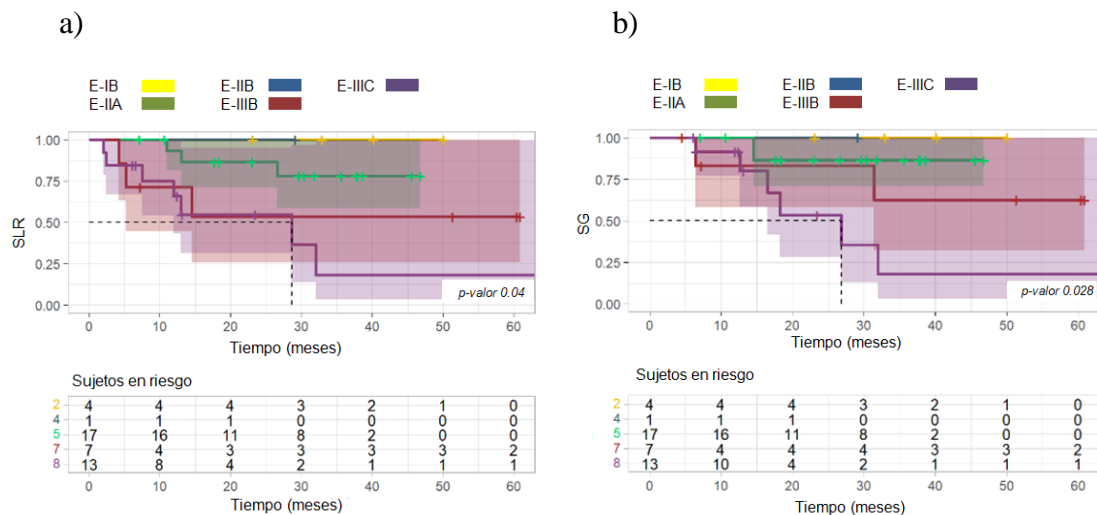


Figura 43. Curva de Kaplan-Meier para supervivencia libre de recaída (SLR) y supervivencia global (SG) en función del estadio clínico (E-IB, E-IIA, E-IIB, E-IIIB, E-IIIC). a) SLR. b) SG. La línea amarilla simboliza a las pacientes con E-IB, la verde E-IIA, la azul E-IIB, la roja E-IIIB y la morada al E-IIIC. P valores obtenidos en el test de log-rango.

Resultados

- **BRCA1/2:** Entre las pacientes testadas para *BRCA1/2* a nivel germinal, en los análisis de supervivencia no se detectaron diferencias pronósticas en función de si presentaron o no mutación.

- **Tipo de QT:** Respecto al esquema quimioterápico empleado en neoadyuvancia, no se encontraron diferencias en cuanto a SLR (*p*-valor 0.76). Asimismo, a pesar de haberse observado un importante beneficio de 9 meses en la SG en las pacientes en las que se incluyó carboplatino en el tratamiento (56 meses vs. 47 meses), los resultados no han sido estadísticamente significativos (*p*-valor 0.68).

- **Respuesta patológica a la QTN:** Las pacientes que obtuvieron una RCp tras la administración de la QTN presentaron una mejor SLR (31 meses vs. mediana no alcanzada, *p*-valor 0.013) y una mejor SG (mediana de SG no alcanzada en ninguna de las ramas, *p*-valor 0.036) (figura 44). Además, destaca que ninguna de las pacientes de la cohorte que obtuvieron una RCp presentó recaída de la enfermedad tumoral.

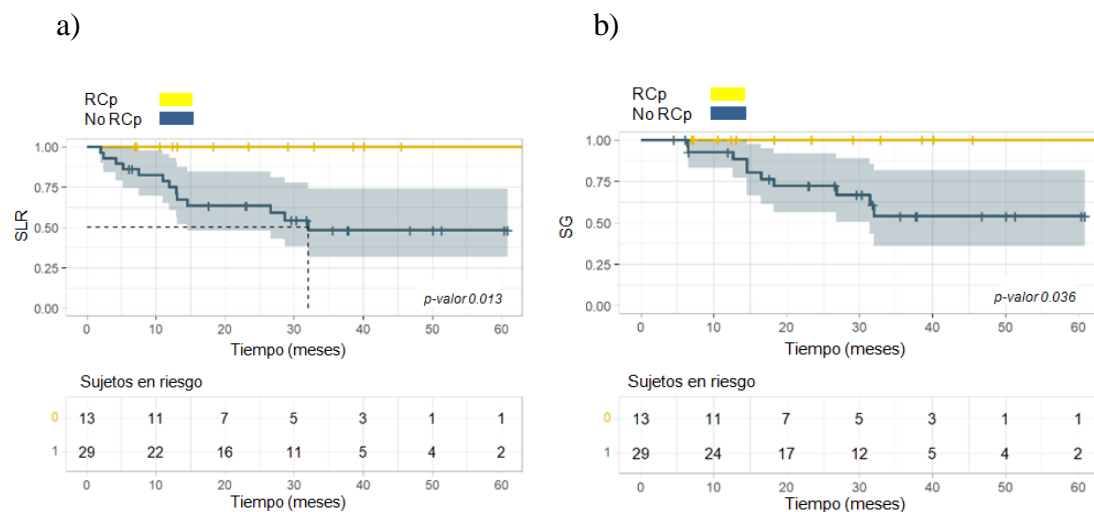


Figura 44. Curva de Kaplan-Meier para supervivencia libre de recaída (SLR) y supervivencia global (SG) según el tipo de respuesta patológica (RCp vs. no RCp). a) SLR. b) SG. La línea amarilla simboliza a las pacientes que obtuvieron una RCp tras la QTN, mientras que la línea azul representa a las pacientes que no alcanzaron una RCp tras neoadyuvancia. *P* valores obtenidos en el test de log-rango.

5.4.2 Análisis de supervivencia de las variables histopatológicas en tejido

- **Grado histológico:** Las pacientes con tumores bien (G1) o moderadamente diferenciados (G2) presentaron una mejor SLR (32 meses vs. mediana no alcanzada, p -valor 0.04) respecto a los tumores pobremente diferenciados (G3), así como una tendencia a un aumento de SG (mediana no alcanzada en ninguna de las ramas, p -valor 0.08) (figura 45).

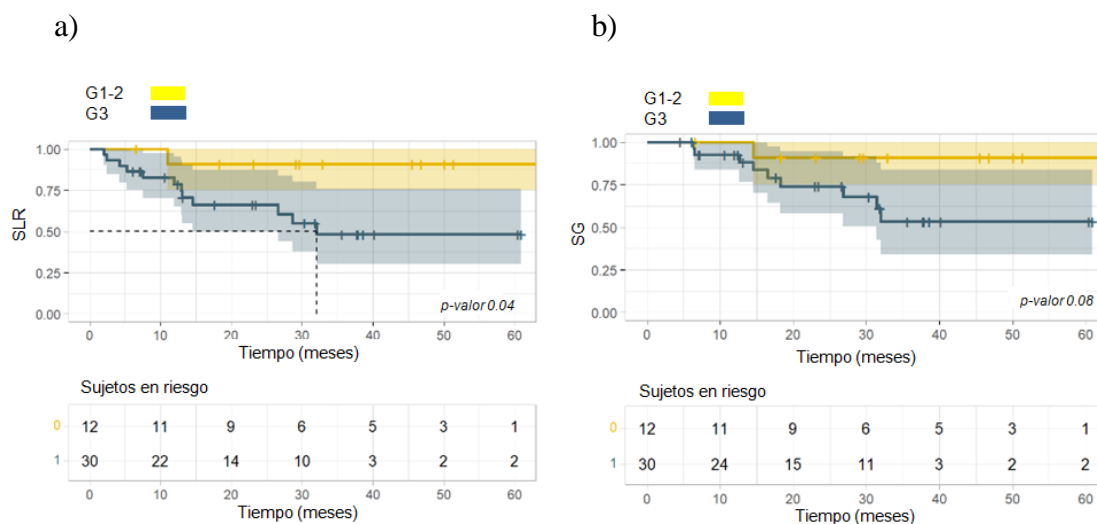


Figura 45. Curva de Kaplan-Meier para supervivencia libre de recaída (SLR) y supervivencia global (SG) en función del grado histológico (G1-2 vs. G3). a) SLR. b) SG. La línea amarilla simboliza a las pacientes con tumores de G1 y G2, mientras que la línea azul representa a las pacientes con tumores G3 o pobremente diferenciados. P valores obtenidos en el test de log-rango.

- **Ki-67:** En el análisis de supervivencia, el índice de proliferación, evaluado a través de la expresión de Ki-67, no se ha correlacionado con la SLR ni con la SG.

- **Baja expresión del Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2 low):** No se encontraron diferencias en términos de SLR ni de SG entre las 33 pacientes con HER2 negativo (HER2 null o cero) vs. las 9 pacientes que presentaron una baja expresión de HER2 o HER2 low (HER2 1+ y HER2 2+ con FISH no amplificado).

- **Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR):** En el presente estudio, la expresión por IHQ de *EGFR* no se ha relacionado con la SLR ni con la SG.

- **Receptor de andrógenos (RA):** En la cohorte de pacientes de CMTN no se encontraron diferencias pronósticas entre las 5 pacientes con expresión de RA por IHQ y las 37 restantes que no mostraron ningún tipo de expresión para RA.

- **Linfocitos infiltrantes de tumor (TILs):** Las pacientes que tuvieron en la biopsia del tumor una expresión de TILs superior o igual al 30%, alcanzaron una mejor SLR (28 meses vs. mediana no alcanzada, *p*-valor 0.0047) y SG (32 meses vs. mediana no alcanzada, *p*-valor 0.031), con un riesgo de muerte 2.25 veces menor en comparación con las pacientes que presentaron un infiltrado linfocitario inferior al 30% (figura 46). No se encontraron diferencias pronósticas en función de la localización de los linfocitos (intra y peritumorales) ni tampoco entre la proporción de linfocitos CD4+ y CD8+.

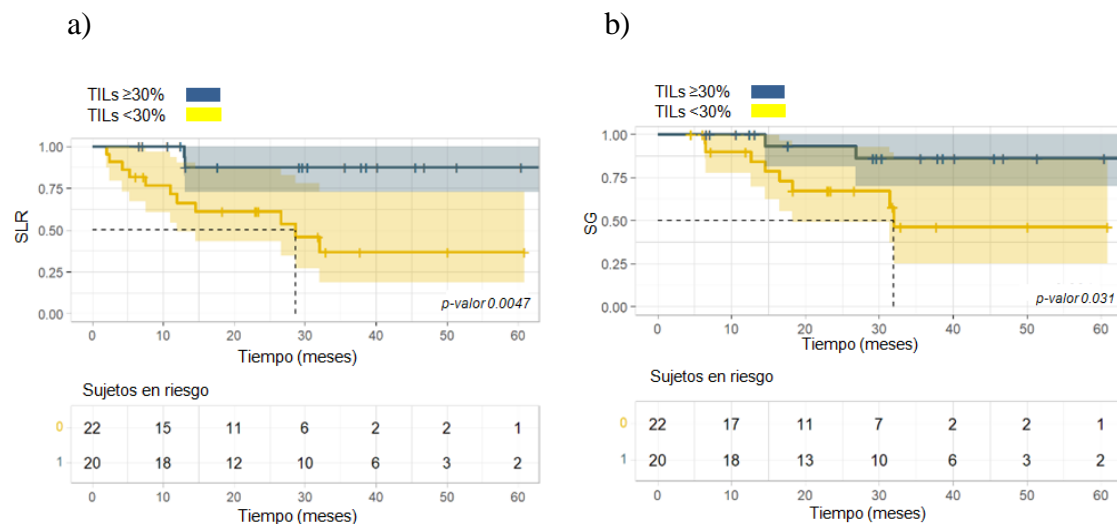


Figura 46. Curva de Kaplan-Meier para supervivencia libre de recaída (SLR) y supervivencia global (SG) según la expresión de TILs ($\geq 30\%$ vs. $< 30\%$). a) SLR. b) SG. La línea azul simboliza a las pacientes con expresión de TILs superior o igual al 30%, mientras que la línea amarilla representa a las pacientes con una expresión de TILs inferior al 30%. P valores obtenidos en el test de log-rango.

5.4.3 Análisis de supervivencia de los mediadores solubles

- **Factor de necrosis tumoral α soluble (sTNF α):** En el análisis de supervivencia realizado para sTNF α , se observó que las pacientes que presentaron niveles plasmáticos inferiores a 4.93 pg/ml, se asociaron con una tendencia no significativa a mejor SG (32 meses vs. mediana no alcanzada, *p*-valor 0.1) (figura 47).

Resultados

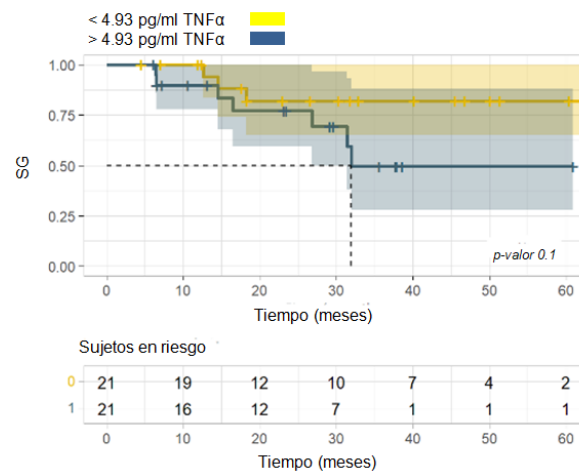


Figura 47. Curva de Kaplan-Meier para supervivencia global en función de los niveles de sTNFα. Los valores de sTNFα fueron dicotomizados respecto a la mediana. La línea amarilla simboliza menores cifras de sTNFα, mientras que la línea azul representa niveles más elevados de sTNFα. P valores obtenidos en el test de log-rango.

- **Galectina-3 soluble (sGal-3):** Respecto a sGal-3, una de las citoquinas solubles con un papel más destacable en el CMTN, se observó una peor SLR (31 meses vs. mediana no alcanzada, *p*-valor 0.049) y una tendencia a menor SG (32 meses vs. mediana no alcanzada, *p*-valor 0.06) en las pacientes con cifras plasmáticas más elevadas de sGal-3 (>4143.66 pg/ml) (figura 48).

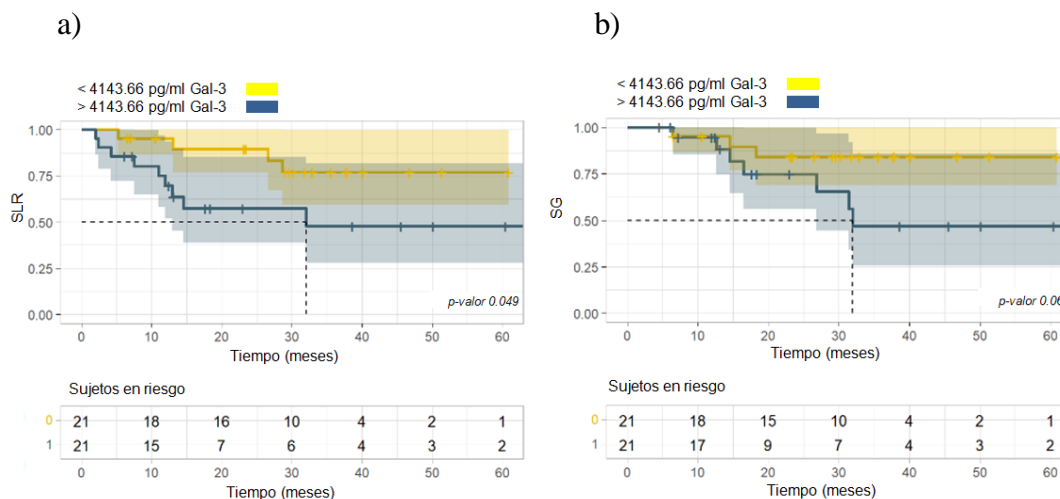


Figura 48. Curva de Kaplan-Meier para supervivencia libre de recaída (SLR) y supervivencia global (SG) en función de los niveles de sGal-3. a) SLR. b) SG. Los valores de sGal-3 fueron dicotomizados respecto a la mediana. La línea amarilla simboliza menores cifras de sGal-3, mientras que la línea azul representa mayores niveles de sGal-3. P valores obtenidos en el test de log-rango.

Resultados

- **Proteína inflamatoria de macrófagos 3 α soluble (sMIP-3 α):** Una mayor concentración plasmática de sMIP-3 α (>17.46 pg/ml) se correlacionó con una tendencia no significativa a menor SLR (*p*-valor 0.08) y con una peor SG (32 meses vs. mediana no alcanzada) de manera significativa (*p*-valor 0.005) (figura 49).

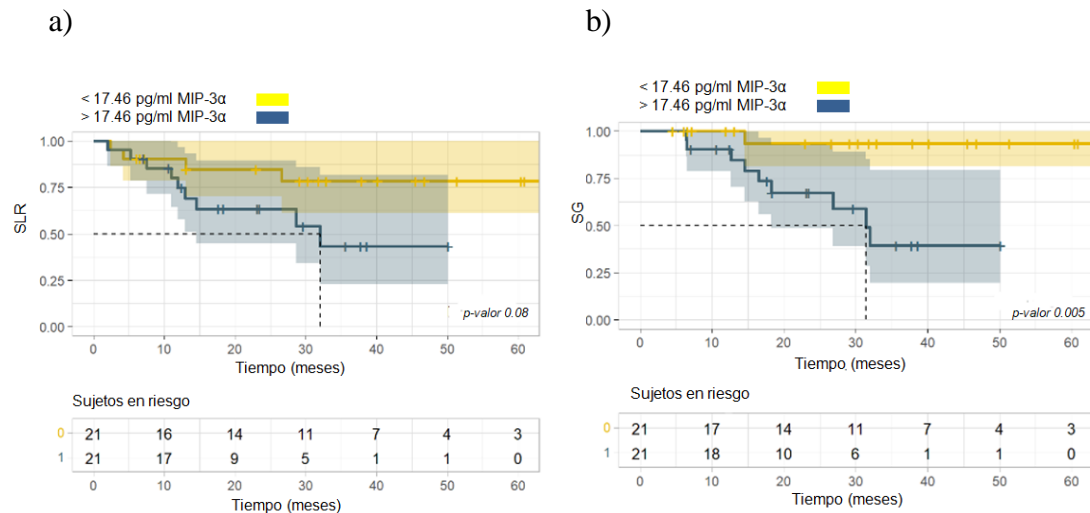


Figura 49. Curva de Kaplan-Meier para supervivencia libre de recaída (SLR) y supervivencia global (SG) según los niveles de sMIP-3 α . a) SLR. b) SG. Los valores de sMIP-3 α fueron dicotomizados respecto a la mediana. La línea amarilla simboliza menores cifras de sMIP-3 α , mientras que la línea azul representa niveles más elevados de sMIP-3 α . P valores obtenidos en el test de log-rango.

- **Interleucina 5 soluble (sIL-5):** Las pacientes en las que se detectaron unas cifras plasmáticas de sIL-5 superiores a 2.81 pg/ml se asociaron con una tendencia a peor SG sin llegar a la significación estadística (32 meses vs. mediana no alcanzada, *p*-valor 0.1) (figura 50).

Resultados

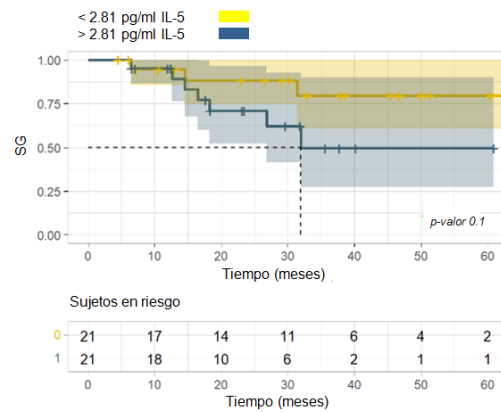


Figura 50. Curva de Kaplan-Meier para supervivencia global en función de los niveles de sIL-5. Los valores de sIL-5 fueron dicotomizados respecto a la mediana. La línea amarilla simboliza menores cifras de sIL-5, mientras que la línea azul representa mayores niveles de sIL-5. P valores obtenidos en el test de log-rango.

- **Interleucina 8 soluble (sIL-8):** Las pacientes que tuvieron unas cifras de sIL-8 menores de 4.98 pg/ml se asociaron con una tendencia a mejor SG (mediana no alcanzada en ningún brazo) aunque sin llegar a ser significativamente estadístico (p -valor 0.08) (figura 51).

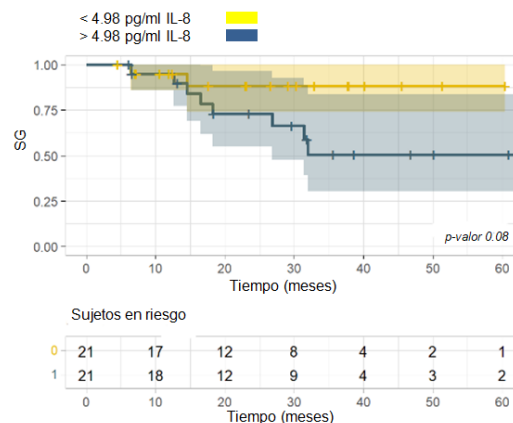


Figura 51. Curva de Kaplan-Meier para supervivencia global en función de los niveles de sIL-8. Los valores de sIL-8 fueron dicotomizados respecto a la mediana. La línea amarilla simboliza menores cifras de sIL-8, mientras que la línea azul representa niveles más elevados de sIL-8. P valores obtenidos en el test de log-rango.

- **Interleucina 10 soluble (sIL-10):** Los análisis mostraron que la detección de altos niveles de sIL-10 por encima de 8.27 pg/ml, se relacionaron claramente con una menor

Resultados

SLR (p -valor 0.002) y una peor SG (32 meses vs. mediana no alcanzada, p -valor 0.006), como se puede apreciar en la figura 52.

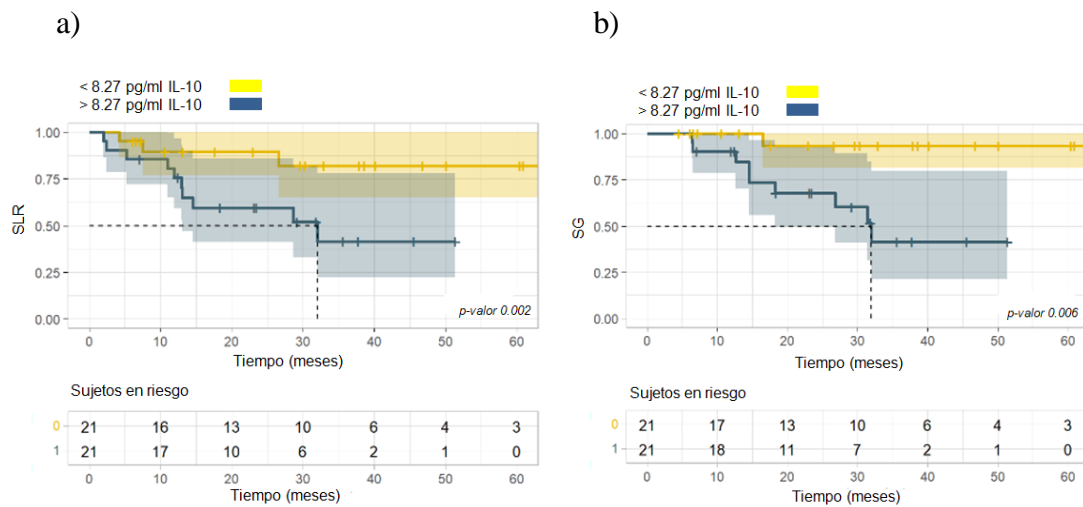


Figura 52. Curva de Kaplan-Meier para supervivencia libre de recaída (SLR) y supervivencia global (SG) en función de los niveles de sIL-10. a) SLR. b) SG. Los valores de sIL-10 fueron dicotomizados respecto a la mediana. La línea amarilla simboliza menores cifras de sIL-10, mientras que la línea azul representa mayores niveles de sIL-10. P valores obtenidos en el test de log-rango.

- **Interleucina 13 soluble (sIL-13):** Mayores cifras de sIL-13 (>3.74 pg/mL) se asociaron con una tendencia a peor SLR (p -valor 0.06) y con una menor SG de manera significativa (32 meses vs. mediana no alcanzada, p -valor 0.009) (figura 53).

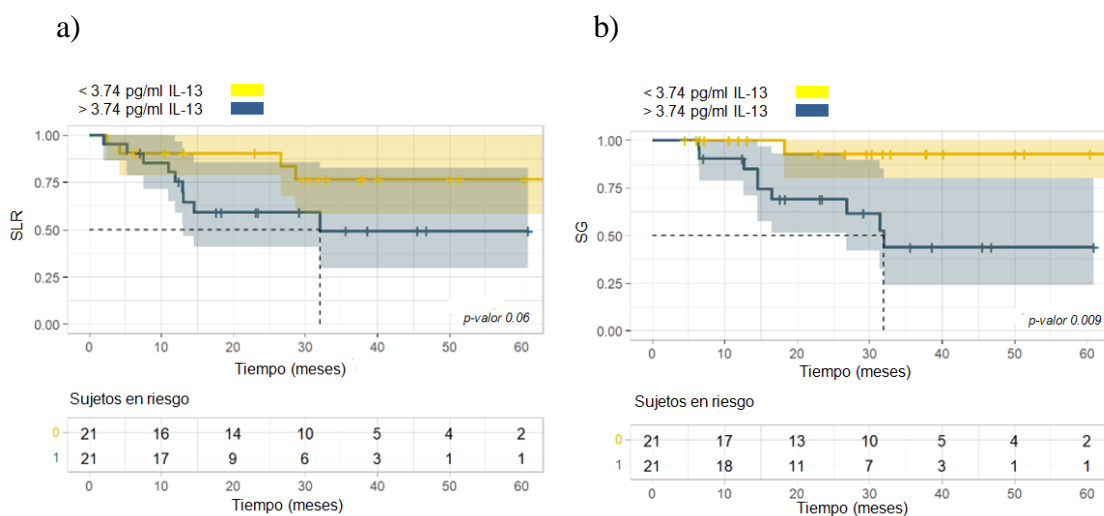


Figura 53. Curva de Kaplan-Meier para supervivencia libre de recaída (SLR) y supervivencia global (SG) en función de los niveles de sIL-13. a) SLR. b) SG. Los valores de sIL-13 fueron

Resultados

dicotomizados respecto a la mediana. La línea amarilla simboliza menores cifras de sIL-13, mientras que la línea azul representa niveles más elevados de sIL-13. P valores obtenidos en el test de log-rango.

- Interleucina 17A soluble (sIL-17A): A pesar de que no se obtuvo una clara relación de sIL-17A con la SLR, sí que se observó que unos niveles en plasma inferiores a 8.17 pg/ml de sIL-17A se correlacionaron con una mejoría de la SG (32 meses vs. mediana no alcanzada, *p*-valor 0.049) (figura 54).

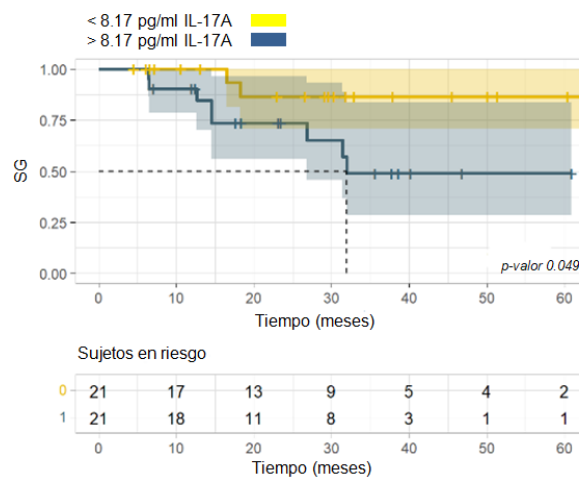


Figura 54. Curva de Kaplan-Meier para supervivencia global según los niveles de sIL-17A. Los valores de sIL-17A fueron dicotomizados respecto a la mediana. La línea amarilla simboliza menores cifras de sIL-17A, mientras que la línea azul representa mayores niveles de sIL-17A. P valores obtenidos en el test de log-rango.

- Inmunoglobulina de células T y dominio de mucina 3 soluble (sTIM-3): El único punto de control inmunitario soluble que tras los pertinentes análisis se asoció con la supervivencia fue sTIM-3. Como se puede observar en la figura 55, una concentración plasmática de sTIM-3 superior a 3261.74 pg/ml se relacionó con una peor SLR (32 meses vs. mediana no alcanzada, *p*-valor 0.049), y con una tendencia no significativa a menor SG (*p*-valor 0.06).

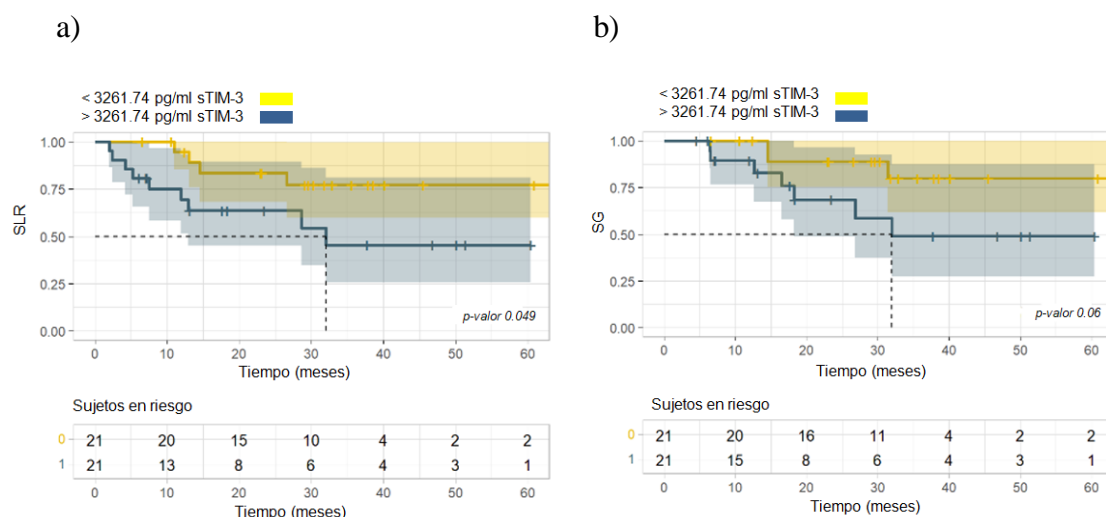


Figura 55. Curva de Kaplan-Meier para supervivencia libre de recaída (SLR) y supervivencia global (SG) en función de los niveles de sTIM-3. a) SLR. b) SG. Los valores de sTIM-3 fueron dicotomizados respecto a la mediana. La línea amarilla simboliza menores cifras de sTIM-3, mientras que la línea azul representa niveles más elevados de sTIM-3. P valores obtenidos en el test de log-rango.

Por lo tanto, los resultados presentados en esta tesis, confirman que en el CMTN precoz las características tumorales como un mayor tamaño, la afectación ganglionar, un estadio clínico más avanzado, un carcinoma pobremente diferenciado, una baja expresión de TILs y no alcanzar una RCp tras la QTN se asocian con una peor supervivencia.

Asimismo, se aporta nueva información en el campo del CMTN con el análisis de biomarcadores no invasivos a través de la biopsia líquida; observándose niveles plasmáticos más elevados de ciertas citoquinas y puntos de control inmunitario en las pacientes con mayor carga tumoral, indicando un posible aumento del estatus proinflamatorio ocasionado una mayor resistencia a la actividad antitumoral del sistema inmune.

Además, altas cifras de sGal-3 y sGM-CSF, así como bajos niveles de sCD86 y sITAC, fueron predictivos de una menor respuesta a la QTN; mientras que el aumento de niveles plasmáticos de sGal-3, sMIP-3 α , sIL-10, sIL-13, sIL-17A y sTIM-3, se relacionaron con una peor supervivencia, siendo estos marcadores útiles para determinar el pronóstico de la enfermedad y continuar investigando para encontrar nuevas dianas terapéuticas y tratamientos más efectivos contra el CMTN (figura 56).

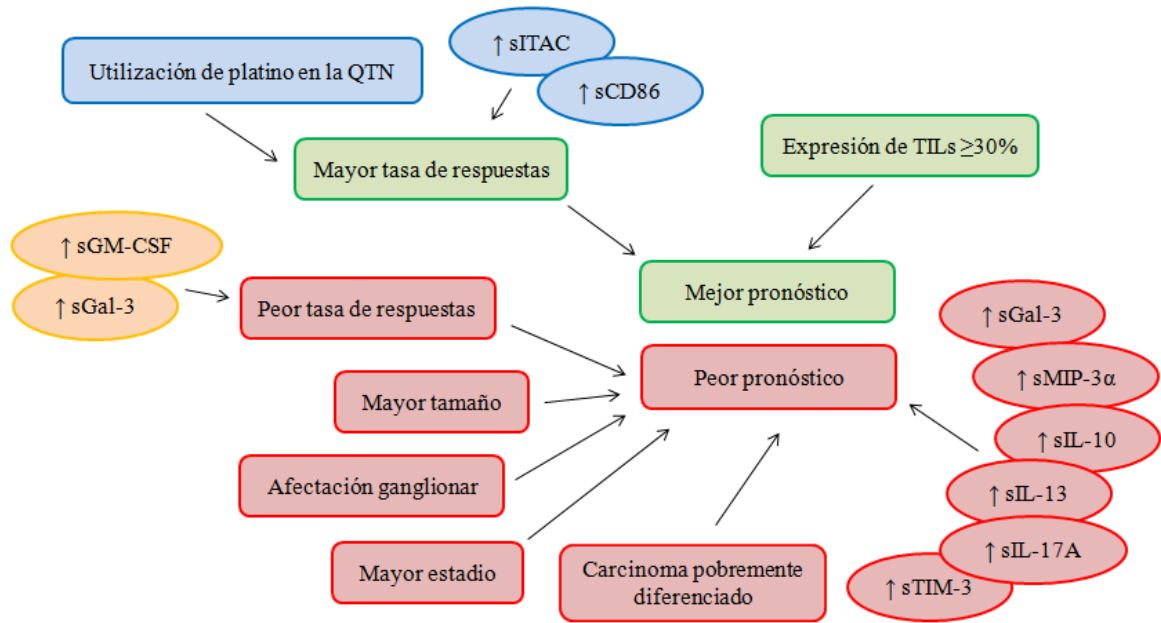


Figura 56. Resumen de los diversos marcadores tanto a nivel clínico, como tisular y plasmático; así como su valor predictivo de respuesta a QTN y valor pronóstico en la cohorte de pacientes de CMTN precoz. Gráfica de elaboración propia.

6 DISCUSIÓN

6.1 DISCUSIÓN DE LAS VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE LA ENFERMEDAD

El CMTN representa alrededor del 10-20% de todos los CM y se define de forma estándar mediante técnicas de IHQ en la que los tumores presentan $\leq 1\%$ de expresión de RE y RPg, y ausencia de sobreexpresión o amplificación de HER2 de acuerdo con la Sociedad Americana de Oncología Clínica y el Colegio de Patólogos Americanos (ASCO/CAP) [51]. Además, suelen tener un alto grado histológico, mayor índice de proliferación y abundante tejido necrótico.

Este tipo de cáncer tiende a ser más común en mujeres jóvenes y de raza afroamericana o latina si se compara con otros subtipos de CM.

La conducta biológica del CMTN suele ser más agresiva y presentan un mayor número de metástasis a distancia, comparada con los otros subtipos de CM. Tienen una mayor tendencia a desarrollar metástasis viscerales, especialmente a pulmón, sistema nervioso central y en menor medida a hígado y hueso. Asimismo, tiene un curso clínico más agresivo, con recurrencias tempranas y mayor riesgo de muerte en comparación con los tumores hormono-dependientes [54,55].

El CMTN posee un peor pronóstico sobre todo por la falta de tratamientos dirigidos y porque a pesar de las altas tasas de respuesta a la QT, estas respuestas no son prolongadas en el tiempo debido a los mecanismos de resistencia que se desarrollan de forma precoz.

Muchas de las características clínico-patológicas del CMTN han sido correlacionadas con la respuesta al tratamiento y con el pronóstico de la enfermedad.

En la presente tesis la edad media al diagnóstico fue de 55 años, similar a otros estudios [181], siendo el 57.5% de las mujeres posmenopáusicas al diagnóstico.

Los CMTN se suelen asociar con una dimensión tumoral y con una afectación adenopática mayor que otros subtipos. En nuestra cohorte, la media del tamaño tumoral fue de 35 mm, la mayoría con un tumor entre 2 y 5 cm (64.3%). El 61.9% de las mujeres incluidas en nuestro trabajo presentaron afectación clínica ganglionar, similar a los datos de otras cohortes de pacientes en el escenario de enfermedad precoz [182].

En consonancia con la bibliografía previa, los datos obtenidos en la presente tesis mostraron que un mayor tamaño del tumor, la afectación de los ganglios linfáticos, y por lo tanto un estadio tumoral más elevado; confieren una peor supervivencia, siendo estos, los factores clínicos pronósticos más importantes para la supervivencia libre de recaída (SLR) y supervivencia global (SG) en el CMTN [183,184].

El CMTN se asocia con mayor frecuencia a mutaciones en *BRCA1/2*. La mutación de los genes supresores de tumores *BRCA1/2* acontece del 10 al 35% de las pacientes con CMTN y puede ocurrir tanto en vía germinal como somática. En este trabajo el 16.7% de las pacientes presentaron mutaciones en línea germinal de *BRCA1/2*, datos que son similares a otras cohortes de pacientes de CMTN.

BRCA1 es un gen que se halla ubicado en el brazo largo del cromosoma 17 y codifica para una proteína encargada de regular el proceso de reparación del ADN. Cuando se produce un daño en el ADN, la proteína *BRCA1* se hiperfosforila y se relocaliza en los sitios de síntesis de ADN, formando un complejo con otras proteínas como *BRCA2* y *Rad51*, encargadas de la reparación del daño al ADN asociado a la replicación. La inhibición de este gen causa un aumento de la proliferación de células del epitelio mamario [17,22].

BRCA2 es un gen que se halla ubicado en el brazo largo del cromosoma 13. Al igual que *BRCA1*, el producto génico de *BRCA2* está involucrado en el proceso de reparación del ADN, formando un complejo multiproteico con otras proteínas como *Rad 51*, *BARD1* y *BRCA1* [17,23].

En la bibliografía no se han encontrado diferencias pronósticas entre las pacientes portadoras de la mutación en *BRCA1/2* comparadas con las no portadoras [52], al igual que en nuestra cohorte de pacientes donde no se observaron diferencias en la respuesta a la QTN ni en la supervivencia según el estatus mutacional en *BRCA1/2*.

Por otro lado, en el tratamiento sistémico del CMTN se sabe de la importancia de conseguir una RCp después de la QTN, ya que constituye el principal factor pronóstico en CMTN precoz [182]. La RCp ocurre en aproximadamente en un tercio de las pacientes tratadas con QTN utilizando el régimen estándar de antraciclinas y ciclofosfamida seguido de taxanos. Recientemente, se ha observado que la adición de carboplatino (especialmente en mujeres con mutación de *BRCA1/2*) a los taxanos o la

sustitución de paclitaxel por nab-paclitaxel, puede conllevar a una mejoría de la tasa de RCp, llegando a alcanzar entre el 40 al 60%, y que puede incrementarse con la adición de la inmunoterapia con anti-PD-1/L1 [66]. Sin embargo, las pacientes que no alcanzan una RCp tienen una alta tasa de recurrencia, por lo que en estas circunstancias se beneficiarían del tratamiento adyuvante con capecitabina, cumpliendo este régimen de QT adyuvante un 28.6% de las mujeres de nuestra cohorte [84,185,186]. En este estudio, el tratamiento adyuvante con capecitabina ha sido menor de lo esperado; probablemente debido a que la adyuvancia con QT en pacientes que no alcanzaban una RCp tras QTN, no era todavía un estándar terapéutico al principio del periodo de inclusión de las pacientes.

Respecto al esquema terapéutico, en la presente tesis, las pacientes que recibieron terapia combinada con taxanos y sales de platino obtuvieron unas mejores tasas de respuestas tanto a nivel local como ganglionar y un aumento significativo de RCp en comparación con aquellas pacientes que no llevaron carboplatino. En el grupo de mujeres tratadas con taxanos y platinos la tasa de RCp fue del 58.83%, una tasa de acuerdo a lo descrito en ensayos previos (40 a 60%); sin embargo, en los esquemas sin platinos la tasa de RCp fue de un 12%, menor a lo observado en otros trabajos (~30%). El aumento de la tasa de RCp en las pacientes en las que se adicionó platino a la QTN está en consonancia con otros ensayos previos [79–82]. La RCp tras neoadyuvancia se considera un subrogado de la supervivencia [69,70], observándose en este estudio una tendencia a mejor supervivencia en el esquema con platinos, a pesar de no llegar a ser estadísticamente significativa [187,188]. Asimismo, ninguna de las pacientes de nuestra cohorte que obtuvieron una RCp presentó recaída tumoral, siendo así la RCp a neoadyuvancia uno de los factores pronósticos más importantes en el CMTN precoz.

Actualmente, la tasa relativa de supervivencia a 5 años del CMTN localizado está en torno al 90%, del 65% en el localmente avanzado y del 11% en estadios metastásicos [56]. La supervivencia global en caso de recaída metastásica es mucho menor que en los otros tipos de CM, en torno a 12-19 meses, frente a los 5 años del CM luminal y HER2-positivo. Con una mediana de seguimiento de 68.5 meses, el 31% de las pacientes incluidas en este estudio presentaron recaída tumoral y la mortalidad fue del 23.8%. Según la bibliografía previa entre el 20 al 40% de las pacientes con CMTN estadio I-III presenta una recaída locorregional o a distancia, siendo la tasa de supervivencia a 5 años en estadios I del 90%, disminuyendo alrededor de un 60% en estadios II y III [182].

6.2 DISCUSIÓN DE LAS VARIABLES HISTOPATOLÓGICAS DE LA ENFERMEDAD

El carcinoma ductal infiltrante representa el tipo histológico más común de CM y empieza en el revestimiento de los conductos galactóforos (tubos delgados que llevan la leche desde los lobulillos de la mama hasta el pezón) y se disemina fuera de los conductos al tejido normal que los rodea. El subtipo histológico más frecuente en la presente tesis fue el carcinoma ductal infiltrante o NST (del inglés, *no special type*), representado el 95.2% de la serie de pacientes de CMTN, en consonancia con otras cohortes de CMTN [181]. El 4.8% de los tumores hallados se incluyeron dentro del subtipo de carcinoma apócrino con diferenciación neuroendocrina, caracterizados por una pobre respuesta a la QTN pero considerados de mejor pronóstico en general [189].

El **grado histológico** tumoral se refiere a la descripción microscópica de las células tumorales mediante la técnica de hematoxilina-eosina (H-E). En general, se asigna un grado de 1 a 3, dependiendo de su mayor o menor semejanza con las células normales. Así, en los tumores de grado 1, la organización del tejido del tumor y las células tumorales poseen una apariencia cercana a la normal, y tienden a crecer y a diseminarse más lentamente. Por el contrario, las células y el tejido de los tumores de grado 2 y 3 se diferencian bastante de las células y los tejidos normales y tienden a crecer y a diseminarse con mayor rapidez. La mayor parte de las pacientes de nuestra cohorte (un 71.4%) presentaron un tumor pobremente diferenciado (G3), siendo el grado histológico más frecuente en las pacientes con CMTN [181]. En la bibliografía se encuentran resultados discrepantes con respecto a la implicación pronóstica del grado histológico del tumor en CMTN, asociándose en algunas publicaciones el G3 con una menor SG, pero a pesar de ello, en la mayoría de estudios no se ha encontrado una clara asociación con la supervivencia [181,183]. En este estudio, las pacientes con tumores bien o moderadamente diferenciados (G1-2) presentaron una mejor SLR respecto a los tumores pobremente diferenciados (G3), con una tendencia a una mayor SG.

Una de las técnicas IHQ normalmente realizada en el estudio patológico del CMTN es el **Ki-67**, una proteína nuclear del tipo no histona relacionada con el control de la proliferación celular. Su vida media es de 60 a 90 minutos y es fosforilada por el sistema serina/treonina. Su localización celular e intensidad de expresión están relacionadas con las fases del ciclo celular, pero la mayor intensidad de su expresión se

observa durante la mitosis, a nivel citoplasmático. La expresión de la proteína puede ser detectada a través del estudio IHQ del tejido fijado y embebido en parafina mediante los anticuerpos MIB-1 y MIB-3; su expresión se reporta como el porcentaje de células tumorales teñidas nuclearmente [190]. En este trabajo, el índice de proliferación celular medio medido por Ki-67 fue del 49% [15-99%], en conformidad con otros estudios donde se ha observado que el CMTN es el que presenta un mayor índice de proliferación celular dentro del CM [43]. Un aumento del índice mitótico o Ki-67 se ha asociado en algunos ensayos con una mejor respuesta aumentando la tasa de RCp a QTN, pero con un peor pronóstico en el CMTN [191,192]. Sin embargo, en este estudio, la expresión de Ki-67 no se ha relacionado con la respuesta a la QTN ni con la supervivencia.

Otro de los estudios patológicos realizados en CM es el de la sobreexpresión o amplificación de **HER2**. El gen *HER2* codifica la proteína transmembrana HER2. Su parte extracelular es un receptor que interacciona con factores de crecimiento y su zona intracelular tiene actividad tirosin-quinasa. La estimulación del receptor activa la región tirosin-quinasa que fosforila a una serie de proteínas citoplasmáticas transmitiendo la señal estimuladora al interior de la célula. Una sobreexpresión o amplificación de *HER2* provoca un crecimiento celular descontrolado. Dentro del subtipo de CMTN, se pueden encontrar pacientes con baja expresión de HER2, denominado como HER2 low. Se ha definido a las pacientes HER2 low cuando presentan 1+ o 2+ por IHQ y falta de amplificación del gen *HER2* medida por FISH [162].

HER2 low se expresa en aproximadamente en el 20% de las pacientes con CMTN [162], lo que está en consonancia con la población de este estudio (21.4%). En análisis previos, en el grupo de CMTN HER2 low se observó una menor expresión de Ki-67 y una mayor afectación ganglionar [161]. Al igual que en la presente tesis, en la bibliografía previa, no se han encontrado diferencias en cuanto a valor predictivo de respuesta a QTN ni tampoco en cuanto a supervivencia entre las pacientes de CTMN HER2 low vs. CTMN HER2 cero, tanto en la enfermedad precoz como en avanzada [160–162].

Además, en este estudio, también se analizó la expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico o **EGFR**. El gen *EGFR* pertenece a la familia de receptores tirosina quinasa, y está representado por 4 miembros (HER1 o EGFR, HER2, HER3 y

HER4). La proteína EGFR se encuentra en la superficie de algunas células y se une al factor de crecimiento epidérmico, participando en las vías de señalización celular que controlan la multiplicación y supervivencia celular y su sobreexpresión está relacionada con el crecimiento de las células tumorales [193]. Al menos el 50 % de las pacientes con CMTN sobreexpresan *EGFR*, siendo el subtipo de CM en el que más frecuentemente aparece. En este trabajo se definió como tinción positiva por IHQ (*EGFR* positivo) cuando la extensión fue de 1% o más, presentando sobreexpresión de *EGFR* el 73.8% de las pacientes de nuestra serie. En estudios previos se observó una asociación de la expresión de *EGFR* con parámetros clínico-patológicos más agresivos como la afectación ganglionar; y aunque está en discusión su valor predictivo y pronóstico, parece relacionarse con una mayor capacidad para generar metástasis [193,194]. En este trabajo, la expresión de *EGFR* no se ha relacionado con la respuesta a la QTN ni con la supervivencia. A pesar de numerosos ensayos clínicos con inhibidores de EGFR en CMTN, no se ha obtenido un beneficio de la utilización de esta terapia en pacientes con sobreexpresión de *EGFR*. Esta falta de respuesta al tratamiento se podría explicar debido a la activación de diferentes vías que influyen en el crecimiento tumoral y a la heterogeneidad del microambiente tumoral [195].

En el presente estudio también se incluyó el análisis de la expresión del receptor androgénico (RA) a través de IHQ. El RA es un tipo de receptor nuclear que resulta activado con la unión de cualquiera de las hormonas androgénicas como la testosterona o la dihidrotestosterona. La función principal del RA es el de unirse a factores de transcripción que regulan la expresión génica de diversas proteínas. La sobreexpresión del RA caracteriza un subconjunto molecular distinto de CMTN. La expresión de RA se postula que antagoniza al RE y actúa como un agente antiproliferativo en el CM con expresión del RE, pero facilita la proliferación celular por vías dependientes de receptores de andrógenos en cánceres de mama con RE negativo [189]. Este subtipo de CMTN posee un enriquecimiento en las vías reguladas hormonalmente, incluyendo la síntesis de esteroides y el metabolismo androgénico/estrogénico, manteniendo activadas la señalización a través del RA, de prolactina, *HER4*, y del receptor de estrógenos, a pesar de que la tinción IHQ para el RE es negativa [57]. Esto puede ser debido a que el 1% de las células tumorales expresan niveles bajos de las proteínas del RE, definiéndose como negativa en la IHQ. Otras posibilidades son que sobreexpresen coactivadores transcripcionales de los RE. Se estima una positividad de la expresión de

RA en CMTN aproximadamente del 10-40% [189,196]. El punto de corte para considerar una expresión positiva de RA es motivo de controversia, observando que muchos trabajos no sólo difieren en el punto de corte utilizado sino también en los marcadores y la técnica empleada. En la presente tesis el punto de corte para considerar positividad de RA fue del 1%, y lo presentaron un 11.9% de las pacientes. En la bibliografía, la presencia de RA se relacionó con pacientes con determinadas características, como tumor más pequeño, un grado histológico más bajo, un mayor porcentaje de morfología apócrina y un menor índice de proliferación (Ki67) [189]; sin embargo, en nuestro estudio no se pudo establecer ninguna correlación con las variables analizadas, probablemente debido al limitado tamaño muestral. El papel del RA como biomarcador predictivo y pronóstico en el CMTN es controvertido. En algunos estudios la expresión de RA tiene una peor respuesta a la QTN pero concede un mejor pronóstico; mientras que en otros trabajos, como en este caso, no se ha podido relacionar la expresión de RA con la respuesta al tratamiento ni con la supervivencia [189,196,197]. La creciente evidencia sugiere que este subconjunto puede responder a agentes terapéuticos dirigidos a los RA como enzalutamida [196].

Por último, otro de los marcadores patológicos analizados, fueron los linfocitos infiltrantes de tumor (**TILs**), que son los linfocitos localizados en los infiltrados inflamatorios presentes en los islotes tumorales y en el estroma peritumoral de los tumores sólidos. Estos se componen principalmente de subconjuntos de linfocitos T colaboradores o *helper* (CD4+) y linfocitos T citotóxicos (CD8+). Estudios previos han demostrado que la presencia TILs constituye el factor pronóstico más constante en el CMTN [103]. La estratificación del CMTN basada en la evaluación cuantitativa de los TILs distingue un subgrupo denominado "caliente" (alto porcentaje de TILs) y otro de tumores "fríos" (bajo porcentaje de TILs). El punto de corte para considerar a un tumor como alto expresor de TILs varía entre el 30 al 50% dependiendo del ensayo. En la presente tesis, se ha considerado el punto de corte de alta expresión de TILs en el 30% (media de expresión de la cohorte). Numerosos trabajos han relacionado una mayor infiltración linfocitaria con un aumento en la tasa de RCp tras la terapia neoadyuvante y un mejor pronóstico en CMTN precoz, confiriendo una mejoría de alrededor de un 10% en SLR y SG por cada aumento del 10% de TILs [77,105,106]. Un aumento de los TILs estromales tiene un efecto progresivo en la SG de las pacientes con CMTN [109]. En consonancia con lo expuesto previamente, en este estudio se asoció una mayor

expresión linfocitaria (TILs $\geq 30\%$) con una mejoría en la SLR y SG, con un riesgo de muerte 2.25 veces menor en comparación con pacientes con baja expresión de TILs ($<30\%$). Además, la expresión de TILs podría ser un factor predictivo de respuesta a QTN con carboplatino [107], sin embargo, en este trabajo la expresión de TILs no ha sido un biomarcador predictivo de respuesta a la QTN. El tipo de células linfocitarias que se encuentran en el microambiente tumoral podría tener un papel importante en desarrollo tumoral siendo un tema controvertido dentro del CMTN.

Entre los principales mecanismos inmunorreguladores que se han descrito en el CMTN se encuentran los linfocitos T (**CD4+** y **CD8+**). Sin embargo, las asociaciones entre los niveles de diferentes subconjuntos de células T y subtipos moleculares de CM, así como otros factores pronósticos aún no se han establecido completamente. En la bibliografía disponible se encuentran resultados divergentes en cuanto al valor pronóstico de los linfocitos CD4+, aunque los infiltrados de células T CD4+, que incluyen células T reguladoras y macrófagos asociados a tumores, se han asociado con peores resultados clínicos [198]. De la misma manera, diversas publicaciones presentan resultados discordantes respecto a la infiltración de TILs CD8+. En general, los linfocitos CD8+ se asocian con un buen pronóstico, no obstante, algunos análisis destacan una correlación negativa o ninguna correlación con el pronóstico de la enfermedad [110,113–115]. Otros estudios demostraron que un aumento de TILs intratumorales, tanto de CD4+ como de CD8+ en CMTN precoz se relacionaba con un buen pronóstico con mejoría de SLR y de la SG [199]. De acuerdo con parte de la bibliografía previa, en este trabajo no se encontraron diferencias predictivas ni pronósticas en función de la localización de los linfocitos (intra y peritumorales) ni tampoco entre la proporción de linfocitos CD4+ y CD8+. No obstante, un aumento en la proporción de linfocitos peritumorales y una menor ratio de linfocitos CD4+/CD8+ se ha correlacionado con mayores niveles plasmáticos de algunos puntos de control inmunológico asociados a peores características clínicas como son sPD-1, sCTLA-4, sCD80/B7-1, sLAG-3, sBTLA, sTLR-2, sCD28 y sGITRL en otros. Además, una menor proporción de la ratio de linfocitos intratumorales/peritumorales se ha relacionado con el marcador sCD86, predictivo de mayor respuesta a la QTN en nuestra cohorte de pacientes de CMTN.

6.3 DISCUSIÓN DE LOS MEDIADORES SOLUBLES INMUNES.

Como hemos visto anteriormente, en el CMTN disponemos de varios marcadores tanto a nivel clínico-patológico como en tejido tumoral, los cuales nos pueden ayudar en el pronóstico de esta enfermedad. Sin embargo, hoy en día, se dispone de poca información acerca de biomarcadores no invasivos estudiados mediante la extracción de sangre periférica. Algunos estudios, la mayoría con un escaso número de pacientes, han comenzado a aportar datos de la importancia que tiene el microambiente tumoral y diversos analitos solubles que se encuentran en él, en varios tipos de neoplasias, entre las que se encuentra el CMTN y que se discutirán con detalle a continuación.

6.3.1 Citoquinas solubles.

Las citoquinas son proteínas pequeñas que regulan la función de las células que las producen sobre otros tipos celulares y están asociadas con una variedad de enfermedades humanas que incluyen la inflamación crónica, la disfunción inmune, el cáncer y el desarrollo de metástasis [200]. Los principales tipos de citoquinas son: las interleucinas o interleuquinas (IL), los interferones (IFN), los factores de necrosis tumoral (TNF), los factores estimulantes de colonias (CSF) y el factor transformador del crecimiento (TGF).

La citoquina 11 C-X-C o quimioatrayente alfa de células T inducible por interferón (ITAC) es responsable de la activación y agrupamiento de células T y está altamente expresada en leucocitos de sangre periférica, páncreas e hígado, entre otros [201]. En varios ensayos preclínicos, ITAC contribuyó principalmente a la inhibición de la angiogénesis y la progresión tumoral, constituyendo un excelente biomarcador de buen pronóstico [201,202]. Sin embargo, en otros trabajos, como en el caso del cáncer renal avanzado un aumento de niveles de ITAC se relacionó con un peor pronóstico [203]. Actualmente, se desconoce el valor de ITAC soluble en el CMTN. En nuestro estudio, se observó una menor concentración plasmática de sITAC en tumores de mayor tamaño. Además, altos niveles de sITAC en plasma fueron predictivos de una mejor respuesta ganglionar tras la QTN. Por lo tanto, un aumento de sITAC podría ser un indicador de relacionado con datos clínicos de mejor pronóstico como son un menor tamaño tumoral y una buena respuesta ganglionar.

Otras de las citoquinas más reseñables, son los factores estimulantes de colonias (CSF), que son hormonas naturales que controlan la producción de células sanguíneas circulantes por la médula ósea. El factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (**GM-CSF**), es secretado por muchos tipos de células inmunitarias, incluidos los macrófagos, los mastocitos y las células T, principalmente en respuesta a la activación inmunitaria y las citoquinas inflamatorias, que a su vez median las respuestas inmunitarias [204]. Aunque algunas publicaciones han sugerido que el GM-CSF tiene efectos inhibitorios sobre el crecimiento tumoral, la mayoría de los estudios muestra que el GM-CSF puede promover la progresión tumoral y la propagación de metástasis ejerciendo efectos estimulantes sobre el tumor a través de la inhibición de las células T [205,206]. Además, se ha observado que los niveles plasmáticos de GM-CSF fueron significativamente más altos en pacientes con CM cuando fueron comparadas con sujetos control [207]. En nuestro trabajo, una mayor concentración de sGM-CSF en plasma se asoció con un índice de proliferación celular más elevado y con una peor respuesta a la QTN, indicando que sGM-CSF en plasma podría ser un biomarcador predictivo en CMTN precoz. Sin embargo, las cifras de sGM-CSF no se correlacionaron con la supervivencia. Por lo tanto, el uso de GM-CSF profiláctico o terapéutico que se usa para estimular los granulocitos maduros tras un tratamiento quimioterápico [208], constituiría un tema controvertido en el CMTN.

Otra de las citoquinas analizadas en la presente tesis fue la **fractalquina** o **CX3CL1**. Fractalquina puede actuar como un mediador soluble o unido a la membrana y se expresa en monocitos, células NK, células T y células del músculo liso. Posee un papel en la quimiotaxis y la adhesión de los leucocitos, contribuyendo a la supervivencia de múltiples tipos de células durante la homeostasis y la inflamación [209]. Su papel en las enfermedades neoplásicas no está claro, pudiendo ser un marcador de mejor o de peor pronóstico en función del tipo de tumor [210]; aunque a partir de los datos obtenidos de este trabajo, podemos afirmar que fractalquina no ha demostrado ser un factor predictivo ni pronóstico en CMTN precoz.

El interferón gamma soluble o **IFN- γ** es un tipo de citocina producida por linfocitos T CD4+ y linfocitos NK cuya función más importante es la activación de los macrófagos, tanto en las respuestas inmunitarias innatas como las respuestas celulares adaptativas. Su función es controvertida en la regulación del estado inmunitario y de la inmunidad antitumoral [211]. En este estudio, la fracción plasmática de IFN- γ (s IFN- γ), no se ha

relacionado con la respuesta a la QTN ni con el pronóstico, sin embargo, varias publicaciones parecen indicar que el sIFN- γ posee un papel en el CMTN. En algunos trabajos, el sIFN- γ fue un buen marcador pronóstico y predictivo de respuesta a la inmunoterapia en cáncer [211] y a QT en CMTN [212]. Sin embargo, el sIFN- γ también podría reducir la respuesta inmunitaria y estimular la progresión tumoral y las metástasis en CMTN [165].

El factor de necrosis tumoral α (TNF α) es una citoquina proinflamatoria cuya expresión está aumentada en varios tipos de neoplasias malignas. El TNF α es producido principalmente por macrófagos activados, monocitos, células NK, linfocitos T, neutrófilos y mastocitos, pero también lo pueden expresar células no inmunes como fibroblastos, células endoteliales, miocitos cardíacos y neuronas, entre otras. TNF- α se ha correlacionado con el crecimiento del CMTN a través de la regulación mediante retroalimentación positiva de la proteína que interactúa con la oncoproteína B [166,167]. En algunos estudios previos realizados en pacientes con CM, se ha correlacionado el sTNF α con una mayor carga de enfermedad tumoral, como ocurre en el presente estudio donde las pacientes con afectación ganglionar expresaron mayores cifras de TNF α en plasma. En esta tesis, se observó una tendencia a un empeoramiento de la SG en pacientes con elevados niveles de sTNF α , aunque no estadísticamente significativo. En otras publicaciones, el aumento de la concentración plasmática de TNF α , sí se ha asociado de manera significativa con la aparición de metástasis y un mal pronóstico en general [213,214].

Una de las citoquinas analizadas más destacable es la galectina-3 (**Gal-3**). La Gal-3 es un miembro de la familia de las galectinas, que son proteínas que contienen dominios de reconocimiento a carbohidratos (específicamente β -galactósidos). La Gal-3 se localiza predominantemente en el citoplasma; sin embargo, se transporta al núcleo y se secreta en la superficie celular y en los fluidos biológicos, incluidos el suero y la orina. Presenta funciones importantes en numerosas actividades biológicas, incluido el crecimiento celular, la apoptosis, la diferenciación, la transformación, la angiogénesis, la inflamación y la defensa del huésped entre otras. Numerosos trabajos han indicado que la Gal-3 puede usarse como un biomarcador de diagnóstico o pronóstico para ciertas enfermedades neoplásicas [215,216]. Varios ensayos indican que los niveles plasmáticos de sGal-3 fueron significativamente más elevados en pacientes con cáncer, incluidas pacientes con CM, comparados con sujetos sanos [217,218]. La detección en

plasma de mayores niveles de sGal-3 en pacientes con mayor carga tumoral que se ha observado en la presente tesis, está en la línea con la mayoría de estudios previos [219]. Sin embargo, en la publicación en 2018 de Turkan *et al.*, no se observaron diferencias significativas en los niveles de sGal-3 según las características clínicas y tumorales de las pacientes [220]. También, en algunos estudios recientes sugieren que la isoforma soluble de Gal-3 podría ser un buen biomarcador para predecir la respuesta a QT [219,221], percibiendo en este estudio que unas mayores cifras plasmáticas de sGal-3 predijeron una peor respuesta a nivel ganglionar. La asociación de sGal-3 con una peor SLR o con el desarrollo de metástasis en CMTN que se ha observado en este trabajo, lo que concuerda con los datos analizados en otras publicaciones [222–224].

La proteína inflamatoria de macrófagos 3 α o **MIP-3 α** es una proteína quimiotáctica o quimioatrayente para linfocitos T de memoria y células dendríticas inmaduras. Presenta una regulación positiva por parte de citocinas inflamatorias como IFN γ y TNF α , mientras que está fuertemente regulada a la baja por la IL-10. En el presente trabajo, un aumento en plasma de MIP-3 α (sMIP-3 α), se relacionó con una peor SG en las pacientes con CMTN. Estos resultados están en línea con diversas publicaciones que correlacionan los elevados niveles sMIP-3 α con un peor pronóstico en varios tipos de neoplasias como cáncer de colon, de pulmón y carcinoma nasofaríngeo, entre otros [225–227].

La proteína inflamatoria de macrófagos 1 α (**MIP-1 α**) es una citoquina proinflamatoria expresada por macrófagos, células dendríticas y linfocitos. Posee un papel crucial en la respuesta inmune contra la infección y la inflamación, induciendo la síntesis y liberación de IL-6, IL-10 y TNF α . Los niveles de expresión de MIP-1 α han proporcionado información importante en la progresión de algunas enfermedades infecciosas y cáncer [228]. En este estudio se relacionaron los niveles plasmáticos de MIP-1 α con un aumento del tamaño tumoral. De acuerdo con nuestros resultados, se ha descrito que la expresión de MIP-1 α puede promover la proliferación, migración e invasión en otras neoplasias como cáncer colorrectal e hígado [229].

La proteína inflamatoria de macrófagos 1 β (**MIP-1 β**), al igual que MIP-1 α , es una citoquina proinflamatoria expresada por macrófagos, células dendríticas y linfocitos. Previamente, se ha observado que MIP-1 β está más expresada en personas con CM comparadas con sujetos sanos y además podría tener relación con componente celular

inflamatorio [230]. En la presente tesis, no se ha demostrado relación de sMIP-1 β con ninguna de las variables analizadas.

Uno de los grupos de citoquinas más importantes y abundantes son las **interleucinas o interleuquinas (IL)**. Las IL son un conjunto de citoquinas sintetizadas principalmente por leucocitos aunque en algunos casos también pueden fabricarse por células endoteliales, del estroma del timo o de la médula ósea. Su principal función es mediar en la comunicación intercelular en el sistema inmunitario, incluida la migración, proliferación, maduración y adhesión celular, que desempeña un papel vital en la respuesta inflamatoria [231]. Las IL pueden dividirse en cuatro grandes grupos basados en características estructurales distintas. Sin embargo, su similitud en la secuencia de aminoácidos es bastante débil. El genoma humano codifica más de 50 interleucinas y proteínas relacionadas. En estudios recientes, se ha comprobado que las interleucinas como IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-21, IL-23 entre otras, determinan el establecimiento, la proliferación y la migración en el CM, afectando a la invasión y metástasis de la enfermedad, induciendo angiogénesis y crecimiento tumoral, actuando así como factores de mal pronóstico y de recaída de enfermedad [163,164].

En publicaciones previas, se observaron que las concentraciones plasmáticas elevadas de IL-6, IL-8 e IL-10 estuvieron fuertemente asociadas con el CM (incluyendo a pacientes con CMTN) y se correlacionaron con el estadio clínico de la enfermedad [232,233]. También se asociaron elevadas concentraciones de interleuquinas en pacientes con CM comparadas con sujetos sanos, siendo muy abundantes sIL-6 e sIL-8. Además, sIL-2, sIL-6, sIL-8, sIL-10 e sIL-13 exhibieron mayores niveles de expresión en tumores triple negativos [230].

En la presente tesis, mayores niveles de sIL-8 se han relacionado con un aumento del tamaño tumoral y del estadio clínico, así como una tendencia a peor SG. Además, altos niveles de sIL-6 se asociaron con una disminución del infiltrado linfocitario tumoral, que sabemos que está relacionado con una peor supervivencia.

El aumento de la concentración de sIL-10 se observó en pacientes con CM (especialmente del subtipo CMTN) y se asoció con malos resultados clínicos en el estudio de Sheikhpour *et al.* [234], al igual que en este trabajo, en el que se encontró una clara relación de sIL-10 con una menor SLR y SG.

En lo que concierne a los niveles plasmáticos de sIL-13 en CM, prácticamente no hay bibliografía disponible, pero en algunos ensayos se observó que la expresión tisular de los receptores de IL-13 podría promover la aparición de metástasis en el CMTN [235]. En este estudio, mayores cifras de sIL-13 se relacionaron con una peor SLR y menor SG, lo que podría apoyar el posible papel de la sIL-13 plasmática en la formación de metástasis.

Otra interleuquina con un papel importante en CM es la sIL-17A, que parece estar elevada en tumores de mama especialmente en el subtipo de CMTN [236,237]. A pesar de los pocos estudios publicados, en este trabajo se confirma el papel de la sIL-17A como un biomarcador de mal pronóstico en el CMTN.

En base a los resultados obtenidos en la presente tesis, elevados niveles de IL en plasma como sIL-5, sIL-6, sIL-8, sIL-10, sIL-13 e sIL-17A permitirían identificar a pacientes con CMTN que presenten características clínicas más agresivas o un peor pronóstico, pudiendo beneficiarse de un manejo más agresivo o de la combinación de nuevos agentes terapéuticos en su tratamiento.

6.3.2 Puntos de control inmunológico solubles.

Los puntos de control inmunitarios son reguladores del sistema inmune. Estas vías son cruciales para la autotolerancia, lo que evita que el sistema inmunológico ataque a las células de forma indiscriminada [238].

Uno de los puntos de control inmunológico más estudiados es la proteína de muerte celular programada-1 o **PD-1**. PD-1 es una proteína transmembrana expresada en las células T y B que ayuda al cuerpo a mantener bajo control las respuestas inmunitarias. PD-1 es un punto de control inmunológico y protege contra la autoinmunidad a través de dos mecanismos. En primer lugar, promueve la apoptosis de las células T específicas de antígeno en los ganglios linfáticos y, en segundo lugar, reduce la apoptosis en las células T reguladoras (células T supresoras antiinflamatorias).

En el cáncer, la interacción de PD-1 con su ligando PD-L1 (ligando de la proteína de muerte celular programada-1), genera un entorno inmunosupresor para el crecimiento tumoral. El bloqueo con anticuerpos monoclonales dirigidos (anti-PD-1/anti-PD-L1) ha mostrado resultados clínicos notables en varios tipos de neoplasias.

Las formas solubles de PD-1 (sPD-1) se han detectado en plasma en personas con cáncer, y los niveles elevados se han asociado con el estadio clínico y la enfermedad avanzada [239,240]. Numerosos estudios han revelado que sPD-1 está elevado en pacientes con varios tipos de cáncer y pueden predecir un estado más avanzado de la enfermedad y, en menor medida, un peor pronóstico [241–244]. El aumento de sPD-1 en tumores de mayor tamaño y en estadios más avanzados observado en este estudio concuerda con los datos previos. Elevadas concentraciones de sPD-1 en plasma se ha relacionado con una peor respuesta a la QTN en CMTN [244], a pesar de que en la presente tesis no se han encontrado diferencias predictivas de respuesta a la QTN. Además, sPD-1 podría estar involucrado en la resistencia a la terapia con anticuerpos anti-PD-1 en diferentes tipos de tumores [245]. Estas formas solubles de PD-1 pueden producirse para mantener la autotolerancia periférica y la evasión inmunitaria, alterando el equilibrio inmunológico. En este trabajo, se ha relacionado la concentración de sPD-1 con aumento en la proporción de linfocitos peritumorales y de linfocitos CD4+, pero se desconoce la implicación que pueda tener esto dentro de esta patología.

PD-L1 es una proteína transmembrana con un papel inmunorregulador significativo mediante la supresión del sistema inmunitario en procesos fisiológicos como el embarazo, la presentación de antígenos a linfocitos T, y también en procesos patológicos como en las enfermedades inmunitarias, infecciosas o tumorales.

Las formas solubles de PD-L1 (sPD-L1) también se han detectado en plasma en personas con cáncer, y los niveles elevados se han asociado con el estadio clínico y la enfermedad avanzada [241]. Varios ensayos han revelado que los niveles plasmáticos elevados de sPD-L1 se han correlacionado con un peor pronóstico [241,246]. Además, los niveles elevados de sPD-L1 se asociaron con tumores de mayor tamaño y una peor tasa de respuesta a QTN en CMTN [244] y una disminución de la eficacia del tratamiento con anti-PD-1 en CM. En contraposición a lo comentado previamente, en un estudio publicado en 2021 [247] no se encontraron diferencias en los niveles de sPD-L1 entre pacientes con CM y mujeres sanas. Tampoco hubo una correlación entre la expresión de PD-L1 en la lesión tumoral y los niveles séricos de sPD-L1. En nuestro trabajo, sPD-L1 no se asoció a la respuesta ni con la supervivencia.

Otro ligando relevante de PD-1 es **PD-L2** (ligando 2 de la proteína de muerte celular programada). PD-L2 es una proteína que presenta un papel como regulador negativo de

la respuesta inmunitaria adaptativa. Algunos estudios señalan que la expresión de PD-L2 en las células tumorales y del estroma se relacionan con peores datos clínicos, como en una publicación en la que una mayor expresión de PD-L2 se asoció con una menor SLR en cáncer de mama con estrógenos positivos [248].

En la bibliografía previa hay pocos estudios acerca de la función de sPD-L2 en las enfermedades neoplásicas, detectándose menores niveles de sPD-L2 en pacientes sanos [249]. En este trabajo se asociaron altos niveles de sPD-L2 con carcinomas pobremente diferenciados, que es un factor de mayor agresividad tumoral. Además, también se observó que mayores cifras de sPD-L2 se relacionaron con una baja expresión de HER2 (HER2 low) en comparación con HER2 cero y con una mayor proporción de linfocitos CD4+, sin implicaciones pronósticas.

El antígeno 4 del linfocito T citotóxico (**CTLA-4**) es un receptor proteico situado en la membrana de los linfocitos T y que actúa como coestimulador transduciendo una potente señal inhibitoria. Además, se puede generar una forma soluble, denominada sCTLA-4. En ensayos recientes, en algunas enfermedades como en el CM (incluidas pacientes con CMTN), se han observado concentraciones más elevadas de sCTLA-4 en comparación con el plasma de sujetos sanos, sin apreciarse una clara relación con las variables clínico-patológicas del tumor [250,251]. Las publicaciones previas podrían estar en consonancia con el resultado obtenido en la presente tesis, al encontrarse niveles más elevados de sCTLA-4 en pacientes con tumores más avanzados. Además, sCTLA-4 se relacionó con un aumento en la proporción de linfocitos peritumorales respecto a los intratumorales y de linfocitos CD4+ respecto a CD8+, desconociéndose a día de hoy su valor práctico y clínico.

La interacción de CTLA-4 con sus ligandos funcionales, el grupo de diferenciación 80 (**CD80/B7-1**) o el grupo de diferenciación 86 (**CD86/B7-2**), puede regular negativamente las respuestas de las células T, probablemente mediante eventos de señalización intracelular e independientemente de la interacción con el ligando coestimulador CD28 (grupo de diferenciación 28) [252].

CD80 es una glucoproteína de estructura similar a las inmunoglobulinas cuya acción consiste en la mediación en la adhesión de las células T con las células presentadoras de antígenos y se expresa especialmente en la superficie de monocitos activados, linfocitos B y células dendríticas [170]. Recientemente, se ha observado que la forma plasmática

de CD80 tiene una doble función, ya que previene la inmunosupresión mediada por PD-L1 y, al mismo tiempo, proporciona una segunda señal para la activación de las células T [253]. No se encontraron datos previos del papel de sCD80 en el CM, relacionándose en este trabajo, los niveles de sCD80 con estadios más avanzados y con un aumento en la proporción de linfocitos peritumorales y de linfocitos CD4+. Los datos obtenidos en la presente tesis podrían indicar que sCD80 se asocia con peores datos clínicos en el CMTN.

Por otro lado, CD86 es una proteína coestimuladora, imprescindible para la activación del linfocito T virgen, similar al CD80. Uno de sus ligandos principales es el CD28, pero varía su distribución celular, expresándose fundamentalmente en los monocitos y los linfocitos B activados. La forma soluble de CD86 es producida por monocitos en reposo y parece ser una molécula coestimuladora funcional que juega un papel importante en la vigilancia inmunológica [170]. A pesar de que existen pocos estudios con sCD86, se ha observado mayores niveles de sCD86 en algunos tipos de tumores como mieloma múltiple comparado con sujetos sanos [254], y también una asociación con una peor respuesta y supervivencia en pacientes con leucemia mieloide [255]. Sin embargo, en nuestro trabajo, niveles elevados de sCD86 fueron predictivos de una mejor respuesta a la QTN, aunque no se relacionó con la supervivencia. Además, bajos niveles de sCD86 se relacionaron con una menor proporción de la ratio de linfocitos intratumorales/peritumorales.

Como se comenta previamente, **CD28** es una molécula considerada como uno de los receptores más importantes en las células T, necesaria para la completa activación celular. La familia CD28 está compuesta por receptores coinhibidores y coestimuladores. Los tres receptores coinhibidores son PD-1, CTLA-4 y el atenuador de linfocitos B y T (BTLA). Una investigación previa observó que la isoforma soluble de CD28, sCD28, presentaba menores niveles en pacientes con CM precoz en comparación con pacientes sanas [256]. En contraposición, en otro estudio determinó que las cifras de sCD28 fueron más elevadas en pacientes con CM en comparación con sujetos sanos [251]. En consonancia estos últimos datos, en nuestro estudio, se observaron mayores cifras de sCD28 en tumores localmente avanzados *vs* localizados. Además, también se asociaron altos niveles de sCD28 con un aumento en la proporción de linfocitos peritumorales y CD4+. Todavía se desconoce si sCD28 tiene un valor predictivo o

pronóstico en CMTN, aunque en este estudio no se ha relacionado con la respuesta a QTN ni con la supervivencia.

BTLA pertenece a la superfamilia CD28 y es similar a PD-1 y a CTLA-4 en términos de estructura y función. BTLA se puede detectar en la mayoría de los linfocitos e induce inmunosupresión al inhibir la activación y proliferación de células B y T. Análisis previos reportaron que BTLA en tejido tumoral no es pronóstico en el CM [257], pero a día de hoy, no se han encontrado datos sobre el valor de la fracción soluble de BTLA en plasma en CM. En este estudio, se observaron cifras más altas de sBTLA en tumores localmente avanzados, en estadios más avanzados y en pacientes con mayor proporción de linfocitos peritumorales y CD4+, indicando una mayor cantidad de sBTLA a mayor carga tumoral.

El coestimulador inducible soluble (**ICOS**) es una molécula relacionada con CD28 que se expresa exclusivamente en las células T activadas. La vía coestimuladora de ICOS y su ligando desempeñan un papel fundamental en la modulación de la respuesta inmunitaria en el cáncer (incluido el CM) [258]. Aunque parece que ICOS tisular pueda estar asociado con un peor pronóstico en CM al promover la amplificación de las células T CD4+ inmunosupresoras a través de células dendríticas, aún no se conoce el papel de las isoformas solubles en relación con el pronóstico del cáncer [258,259]. En el presente trabajo se observaron un aumento de los niveles de sICOS en tumores localmente avanzados, sin una evidente implicación pronóstica en el CMTN precoz.

Otro punto de control inmunológico en estudio es la activación de linfocitos 3 (**LAG3** o CD223). LAG3 es una molécula que se encuentra en la superficie celular de células T activadas, células NK, células B y células dendríticas plasmocitoides y que desempeña un papel importante, pero actualmente no completamente comprendido, en la función de estas células inmunitarias [260]. Además, LAG3 tiene varios receptores entre los que se encuentra la Gal-3. Se conoce que Gal-3 se une a LAG-3, inhibiendo la función citotóxica de las células T CD8 [261].

sLAG3 se libera mediante el desprendimiento de la membrana celular y proporciona una regulación inmunitaria adicional en la sangre periférica, realizando funciones diferentes a las de la membrana celular, aunque todavía no está totalmente claro el papel de la forma soluble de LAG3. sLAG3 se ha evaluado en diferentes estudios, demostrando un valor predictivo y pronóstico en varios tumores sólidos, incluidos el

CM, el cáncer gástrico, el cáncer de pulmón de células no pequeñas o el de cabeza y cuello [262]. En el CM y gástrico, la detección de sLAG3 se asociaron con un mejor pronóstico. En el cáncer de pulmón, bajos niveles de sLAG3 se asociaron con enfermedad metastásica o localmente avanzada. Mientras que por otro lado, en tumores de cabeza y cuello altas cifras de sLAG3 se correlacionaron con un peor pronóstico [262,263]. Los experimentos in vivo en ratones mostraron que sLAG3 es capaz de promover la respuesta inmune mediada por células, aumentando la expresión de IFN- γ e IL-12 [262]. Actualmente, se están realizando diversos ensayos clínicos que incluyen terapias con anticuerpos monoclonales inhibidores de LAG3 [264]. En este trabajo se relacionaron los altos niveles de sLAG3 con el tamaño tumoral y con un aumento en la proporción de linfocitos peritumorales. Como se detalla previamente, sGAL3, la fracción soluble de uno de los ligandos de LAG3, también se asoció en la presente tesis con un mayor tamaño tumoral, así como con una peor supervivencia, pudiendo estar la vía de LAG3/Gal-3 implicada en una mayor agresividad y un peor pronóstico en el CMTN.

En relación a la inmunoglobulina de células T y dominio de mucina 3 (**TIM-3**), un receptor coinhibitorio que se expresa en la membrana de células T productoras de IFN- γ , células T reguladoras, macrófagos y células dendríticas; se ha demostrado que suprime las respuestas inmunitarias al interactuar con sus ligandos (entre los que se encuentra la galectina 9), con importantes implicaciones oncogénicas.

El metabolito soluble de TIM-3, sTIM-3, también es funcionalmente relevante para la regulación de la respuesta inmune mediada por células T [265]. sTIM-3 se ha encontrado en el plasma de pacientes con cáncer [266], asociado en algunos casos, como en tumores hepatocelulares, con una peor supervivencia [265]. En este trabajo se encontraron menores cifras de sTIM-3 en pacientes con tumores más pequeños y estadios más localizados. También se asoció sTIM-3 con mayor expresión de linfocitos CD4+ y con la baja expresión de HER2. Además, las pacientes que presentaron unos mayores niveles de sTIM-3 obtuvieron una peor SLR y una tendencia a peor SG. Nuestro estudio revela que sTIM-3 está relacionado con tumores más agresivos pudiendo ser una nueva diana terapéutica, lo que avalaría los actuales esfuerzos de los investigadores, los cuáles se están centrando en terapias contra TIM-3 combinadas con anti-PD-1/PD-L1 [267].

También se ha incluido en la presente tesis el análisis del receptor tipo Toll 2 (**TLR-2**) que pertenece a la familia de los receptores “Toll-like” los cuales representan una familia de receptores de reconocimiento de patrones conservados evolutivamente, que son capaces de reconocer una amplia variedad de componentes microbianos [268]. TLR-2 es una proteína de membrana que se expresa en la superficie de ciertas células y reconoce sustancias extrañas y transmite señales apropiadas a las células del sistema inmunitario. En un trabajo previo, se detectó un aumento significativo de la forma soluble de TLR-2 en pacientes con CM en comparación con el grupo control sin enfermedad [269]. En nuestro estudio, las cifras de sTLR-2 se asociaron con un mayor estadio así como un aumento en la proporción de linfocitos peritumorales y CD4+, probablemente en relación con peores datos clínicos en CMTN.

Asimismo, dentro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) se han analizado entre otros el mediador de entrada del virus del herpes (**HVEM**), el grupo de diferenciación 27 (**CD27**), y el glucocorticoide inducido TNFR relacionado (**GITR**) y su ligando (**GITRL**). Además, en estudios previos se ha demostrado que los receptores primarios de señalización de células T de las familias CD28 y TNFR pueden interaccionar entre ellos [270].

HVEM en condiciones de homeostasis, y por tanto en ausencia de respuesta inmunitaria, actúa como ligando supresor al unirse al receptor BTLA en la superficie de las células T, B y células dendríticas, inhibiendo su activación, aunque también puede interaccionar inhibiendo la respuesta inmunitaria. En trabajos previos, se han identificado mayores niveles de las formas plasmáticas de HVEM en pacientes con cáncer, incluido el CM [271]. En el presente estudio no se ha relacionado sHVEM con ninguna de las variables analizadas.

CD27 funciona como una molécula de punto de control inmunológico coestimuladora. La forma soluble de CD27 podría contribuir a la activación de las células T y estar implicado en la inmunidad tumoral [272]. sCD27 se ha relacionado en trabajos previos con peor pronóstico en algunos tipos de tumores como el cáncer de pulmón [273]. En otro estudio, pacientes con CM precoz obtuvieron niveles de sCD27 más bajos en comparación con pacientes sanas [256], sin embargo en nuestro trabajo, se encontraron cifras más elevadas de sCD27 en tumores localmente avanzados (E-III) comparado con tumores localizados (E-I/II). También se asoció sCD27 a un aumento en la proporción

de linfocitos CD4+ respecto a CD8+. Con los datos obtenidos en esta tesis, se deduce que sCD27 se podría correlacionar con peores datos clínicos en el CMTN precoz.

El **GITR** pertenece a la superfamilia de receptores del Factor de Necrosis Tumoral y estimula tanto la inmunidad adquirida como la innata. Se expresa en varias células y tejidos, incluidas las células T y NK, y es activado por su ligando, **GITRL** (ligando de glucocorticoide inducido TNFR relacionado), que se expresa principalmente en las células presentadoras de antígeno y las células endoteliales cooperando en la respuesta inmune. El sistema GITR/GITRL participa en el desarrollo de respuestas autoinmunes e inflamatorias y potencia la respuesta a infecciones y tumores [274].

Actualmente, todavía se desconoce el papel de la forma soluble tanto de GITR como de GITRL en las enfermedades neoplásicas. En la presente tesis se relacionaron menores niveles de sGITR con una mayor proporción de linfocitos CD8+. Además, se asociaron elevadas cifras plasmáticas de sGITRL con un mayor estadio y un aumento en la proporción de linfocitos peritumorales y CD4+, en ambos casos, sin una implicación terapéutica ni pronóstica.

El último grupo de diferenciación analizado fue **CD40** (grupo de diferenciación 40) que es una proteína que actúa como receptor y se expresa en células presentadoras de antígenos como los linfocitos B, células dendríticas y macrófagos, además de células endoteliales y células del músculo liso. La isoforma soluble de CD40, se detectó en pacientes con cáncer y en algunos ensayos se relacionó con un peor pronóstico como en el caso de tumores de pulmón o colorrectales [275,276]. En este trabajo, sCD40 no se ha correlacionado con ninguna de las variables analizadas.

7 CONCLUSIONES

1. En el CMTN precoz, las pacientes que presentaron al diagnóstico un mayor tamaño tumoral, afectación ganglionar, un estadio clínico más avanzado, así como un carcinoma pobremente diferenciado, se asociaron con una peor supervivencia. Las pacientes que recibieron esquemas con platinos dentro de la QTN, obtuvieron mayores tasas de respuestas completas patológicas, observándose que la obtención de una respuesta completa patológica a neoadyuvancia fue uno de los factores más importantes de buen pronóstico en CMTN precoz.
2. La expresión de Ki67, *EGFR*, HER2 low y receptores androgénicos no demostraron tener un valor predictivo ni pronóstico en CMTN precoz.
3. La expresión media de linfocitos infiltrantes de tumor (TILs) fue del 30%, mayoritariamente peritumorales y CD4+. Se detectó que un aumento de la expresión de linfocitos infiltrantes de tumor (TILs) (independientemente de su distribución y subtipo) se correlacionó con una mejor supervivencia.
4. Las pacientes con mayor carga tumoral presentaron niveles plasmáticos más elevados de ciertas citoquinas y puntos de control inmunitario, lo que podría indicar que, a más carga de enfermedad, se produciría una inmunosupresión por parte del microambiente tumoral favoreciendo la evasión inmunológica tumoral en el CMTN.
5. Altas cifras de sGal-3 y sGM-CSF, así como bajos niveles de sCD86 y sITAC, fueron predictivos de una menor respuesta a la QTN.
6. El aumento de niveles plasmáticos de sGal-3, sMIP-3 α , sIL-10, sIL-13, sIL-17A y sTIM-3 se relacionaron con una peor supervivencia; fortaleciendo potencialmente la utilidad de estos biomarcadores en la planificación del tratamiento y abriendo un abanico de posibilidades en futuras estrategias terapéuticas en este subgrupo de pacientes.

8 BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209–49.
2. Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rubio IT, Zackrisson S, Senkus E. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2019;
3. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin.* 2020;1:7–30.
4. Dyba T. European Cancer Information System. Incidence and mortality estimates 2020. *Eur J Cancer.* 2021;157:308–347.
5. SEOM - Sociedad Española de Oncología Médica. Las cifras del cáncer en España 2023. 2023. p. 1–40.
6. Sociedad Española de Oncología Médica SEOM. Cifras del cáncer en España | SEOM - Día Mundial del Cáncer 2020. SEOM | Día Mundial del Cáncer 2020. 2020.
7. Autier P, Boniol M, LaVecchia C, Vatten L, Gavin A, Héry C, Heanue M. Disparities in breast cancer mortality trends between 30 European countries: Retrospective trend analysis of WHO mortality database. *BMJ.* 2010;341:3620.
8. Allemani C, Weir HK, Carreira H, Harewood R, Spika D, Wang XS, Bannon F, Ahn J V., Johnson CJ, Bonaventure A, et al. Global surveillance of cancer survival 1995-2009: Analysis of individual data for 25 676 887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). *Lancet.* 2015;
9. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.* 2011;144(5):646–74.
10. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. Vol. 12, *Cancer Discovery*. American Association for Cancer Research Inc.; 2022. p. 31–46.
11. Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature.* 2001;411(6835):342–8.
12. McClatchey AI, Yap AS. Contact inhibition (of proliferation) redux. *Curr Opin Cell Biol.* 2012;24(5):685–94.
13. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495–516.
14. Greenberg R. Telomeres, Crisis and Cancer. *Curr Mol Med.* 2005;5(2):213–8.
15. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. Vol. 3, *Nature Reviews Cancer*. 2003. p. 401–10.
16. Van Zijl F, Krupitza G, Mikulits W. Initial steps of metastasis: Cell invasion and endothelial transmigration. Vol. 728, *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*. 2011. p. 23–34.
17. Torrades Sandra. El origen genético del cáncer de mama. *Offarm.* 2003;22(6):108–12.
18. Anderson DE, Badzioch MD. Familial breast cancer risks. Effects of prostate and other cancers. *Cancer.* 1993;72(1):114–9.
19. Williams WR, Anderson DE. Genetic epidemiology of breast cancer: Segregation analysis of 200 Danish pedigrees. *Genet Epidemiol.* 1984;1(1):7–20.

20. Stratton MR, Ford D, Neuhasen S, Seal S, Wooster R, Friedman LS, King MC, Egilsson V, Devilee P, McManus R, et al. Familial male breast cancer is not linked to the BRCA1 locus on chromosome 17q. *Nat Genet.* 1994;7(1):103–7.
21. Begg CB. On the use of familial aggregation in population-based case probands for calculating penetrance. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94(16):1221–6.
22. Hartman AR, Ford JM. BRCA1 induces DNA damage recognition factors and enhances nucleotide excision repair. *Nat Genet.* 2002;32:180–4.
23. Jonkers J, Meuwissen R, Van der Gulden H, Peterse H, Van der Valk M, Berns A. Synergistic tumor suppressor activity of BRCA2 and p53 in a conditional mouse model for breast cancer. *Nat Genet.* 2001;29:418–25.
24. American Cancer Society. Breast Cancer Facts & Figures 2019-2020. *Am Cancer Soc.* 2019;1:1–38.
25. Kamińska M, Ciszewski T, Łopacka-Szatan K, Miotła P, Starosławska E. Breast cancer risk factors. Vol. 14, *Przegląd Menopauzalny*. 2015. p. 196–202.
26. Castelló A, Pollán M, Buijsse B, Ruiz A, Casas AM, Baena-Cañada JM, Lope V, Antolín S, Ramos M, Muñoz M, et al. Spanish Mediterranean diet and other dietary patterns and breast cancer risk: Case-control EpiGEICAM study. *Br J Cancer.* 2014;111(7):1454–62.
27. Koo MM, von Wagner C, Abel GA, McPhail S, Rubin GP, Lyratzopoulos G. Typical and atypical presenting symptoms of breast cancer and their associations with diagnostic intervals: Evidence from a national audit of cancer diagnosis. *Cancer Epidemiol.* 2017;48:140–6.
28. Perry N, Broeders M, de Wolf C, Törnberg S, Holland R, von Karsa L. European guidelines for quality assurance in breast cancer screening and diagnosis. Fourth edition - Summary document. Vol. 19, *Annals of Oncology*. 2008. p. 614–22.
29. Paluch-Shimon S, Cardoso F, Sessa C, Balmana J, Cardoso MJ, Gilbert F, Senkus E, on behalf of the ESMO Guidelines Committee. Prevention and screening in BRCA mutation carriers and other breast/ovarian hereditary cancer syndromes: ESMO clinical practice guidelines for cancer prevention and screening. *Ann Oncol.* 2016;27(5):103–10.
30. Neamțiu L, Bocchi G, Ulutürk A, Bramesfeld A, Saz Parkinson Z, Dimitrova N, Lerda D, Deandrea S, Ambrosio M, Pylkkanen L, et al. European guidelines for breast cancer screening and diagnosis. EUR, Scientific and technical research series. 2016. 1–27 p.
31. González A, González MJ. Los programas de detección precoz del cáncer de mama en España. *Psicooncología.* 2007;4(2–3):249–63.
32. Molina R, Auge JM, Farrus B, Zanón G, Pahisa J, Muñoz M, Torne A, Filella X, Escudero JM, Fernandez P, et al. Prospective evaluation of Carcinoembryonic Antigen (CEA) and carbohydrate antigen 15.3 (CA 15.3) in patients with primary locoregional breast cancer. *Clin Chem.* 2010;56(7):1148–57.
33. Makki J. Diversity of breast carcinoma: Histological subtypes and clinical relevance. *Clin Med Insights Pathol.* 2015;8:23–31.
34. Guzmán-Santos K, Morales-Cordero KV, Hernández-Rodríguez AW, Torres EG, Cabral FG, Sánchez-Rodríguez SH. Carcinoma ductal infiltrante, el tipo de cáncer de mama más común. *Arch Med.* 2012;8(1).

35. Jagsi R, King TA, Lehman C, Morrow M, Harris JR, Burstein HJ. Malignant tumors of the breast. In: DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles & Practice of Oncology. 8th ed. 2018.
36. Kasper D, Fauci A, Hauser S, Longo D, Loscalzo J, Larry J. Harrison Principios de Medicina Interna 19a edición Vol. 2. 19th ed. Journal of Chemical Information and Modeling. 2016. 1–2545 p.
37. Arroyo Yustos M, Martín Angulo M, Álvarez-Mon Soto M. Cáncer de mama. Med. 2017;12(34):2011–23.
38. Tavassoli F a, Devilee P. Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. World Heal Organ. 2003;6(133):250.
39. Lakhani, S, Ellis. I, Schnitt, S, Tan, P, van de Vijver M. WHO Classification of Tumours of the Breast, Fourth Edition. IARC WHO Classification of Tumours, No 4. 2012.
40. Hammond MEH. ASCO-CAP guidelines for breast predictive factor testing: An update. Vol. 19, Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology. 2011. p. 499–500.
41. Wolff AC, Hammond MEH, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, Allred DC, Bartlett JMS, Bilous M, Fitzgibbons P, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast. J Clin Oncol. 2013;31(31):3997–4013.
42. Duffy MJ, Harbeck N, Nap M, Molina R, Nicolini A, Senkus E, Cardoso F. Clinical use of biomarkers in breast cancer: Updated guidelines from the European Group on Tumor Markers (EGTM). Vol. 75, European Journal of Cancer. 2017. p. 284–98.
43. Penault-Llorca F, Radosevich-Robin N. Ki67 assessment in breast cancer: an update. Pathology. 2017;49(2):166–71.
44. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, Senn HJ, Albain KS, André F, Bergh J, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: Highlights of the st gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast Cancer 2013. Ann Oncol. 2013;24(9):2206–23.
45. Dai X, Li T, Bai Z, Yang Y, Liu X, Zhan J, Shi B. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. Vol. 5, American Journal of Cancer Research. 2015. p. 2929–43.
46. Dieci MV, Radosevich-Robin N, Fineberg S, van den Eynden G, Ternes N, Penault-Llorca F, Pruneri G, D'Alfonso TM, Demaria S, Castaneda C, et al. Update on tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer, including recommendations to assess TILs in residual disease after neoadjuvant therapy and in carcinoma in situ: A report of the International Immuno-Oncology Biomarker Working Group on Bre. Vol. 52, Seminars in Cancer Biology. 2018. p. 16–25.
47. 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. Vol. 3, Frontiers in Oncology. 2017. p. 156.
48. Loi S, Drubay D, Adams S, Pruneri G, Francis PA, Lacroix-Triki M, Joensuu H, Dieci MV, Badve S, Demaria S, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes and prognosis: A pooled individual patient analysis of early-stage triple-negative breast cancers. J Clin Oncol. 2019;37(3):371–82.
49. Giuliano AE, Connolly JL, Edge SB, Mittendorf EA, Rugo HS, Solin LJ, Weaver DL,

- Winchester DJ, Hortobagyi GN. Breast Cancer-Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(4):290–303.
50. Martínez Férez IM, Viguera Guerra I, Piedad Rosario Lozano M, Benot López S. Plataformas genómicas de carácter pronósticopredictivo en el cáncer de mama: actualización de la evidencia. *Inf Eval Tecnol Sanit AETSA*. 2018;1–152.
51. Wolff AC, Hammond MEH, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, Allred DC, Bartlett JMS, Bilous M, Fitzgibbons P, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American society of clinical oncology/college of American pathologists clinical practice guideline update. *Arch Pathol Lab Med*. 2014;142(11):1364–82.
52. Gonzalez-Angulo AM, Timms KM, Liu S, Chen H, Litton JK, Potter J, Lanchbury JS, Stenke-Hale K, Hennessy BT, Arun BK, et al. Incidence and outcome of BRCA mutations in unselected patients with triple receptor-negative breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2011;17(5):1082–9.
53. Daly MB, Pilarski R, Berry MP, Buys SS. Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast, Ovarian, and Pancreatic, Version 2.2021, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2021;6(19):77–102.
54. Zaharia M, Gómez H. Cáncer de mama triple negativo: una enfermedad de difícil diagnóstico y tratamiento. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2014;30(4):649–56.
55. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, Karaca G, Troester MA, Chiu KT, Edmiston S, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *J Am Med Assoc*. 2006;295(21):2492–502.
56. Carey LA, Dees EC, Sawyer L, Gatti L, Moore DT, Collichio F, Ollila DW, Sartor CI, Graham ML, Perou CM. The triple negative paradox: Primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res*. 2007;13(8):2329–34.
57. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, Pietenpol JA. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest*. 2011;121(7):2750–67.
58. Uscanga-Perales G.I. , Santuario-Facio S.K. O-LR. Triple negative breast cancer: Deciphering the biology and heterogeneity. *Med Univ*. 2016;18(71):105–14.
59. Lehmann BD, Jovanović B, Chen X, Estrada M V., Johnson KN, Shyr Y, Moses HL, Sanders ME, Pietenpol JA. Refinement of triple-negative breast cancer molecular subtypes: Implications for neoadjuvant chemotherapy selection. *PLoS One*. 2016;11(6):e0157368.
60. Masuda H, Baggerly KA, Wang Y, Zhang Y, Gonzalez-Angulo AM, Meric-Bernstam F, Valero V, Lehmann BD, Pietenpol JA, Hortobagyi GN, et al. Differential response to neoadjuvant chemotherapy among 7 triple-negative breast cancer molecular subtypes. *Clin Cancer Res*. 2013;19(19):5533–40.
61. Stefansson OA, Jonasson JG, Johannsson OT, Olafsdottir K, Steinarsdottir M, Valgeirsdottir S, Eyfjord JE. Genomic profiling of breast tumours in relation to BRCA abnormalities and phenotypes. *Breast Cancer Res*. 2009;11(4):R47.
62. Yam C, Mani SA, Moulder SL. Targeting the Molecular Subtypes of Triple Negative Breast Cancer: Understanding the Diversity to Progress the Field. *Oncologist*. 2017;22(9):1086–93.

63. Lehmann BD, Pietenpol JA. Identification and use of biomarkers in treatment strategies for triple-negative breast cancer subtypes. *J Pathol*. 2014;232(2):142–50.
64. Yu K Da, Zhu R, Zhan M, Rodriguez AA, Yang W, Wong S, Makris A, Lehmann BD, Chen X, Mayer I, et al. Identification of prognosis-relevant subgroups in patients with chemoresistant triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2013;19(10):2723–33.
65. Redig AJ, Mcallister SS. Breast cancer as a systemic disease: A view of metastasis. Vol. 274, *Journal of Internal Medicine*. 2013. p. 113–26.
66. Núñez Abad M, Calabuig-Fariñas S, Lobo de Mena M, José Godes Sanz de Bremond M, García González C, Torres Martínez S, García-García JÁ, Iranzo González-Cruz V, Camps Herrero C. Update on systemic treatment in early triple negative breast cancer. *Ther Adv Med Oncol*. 2021;13:1758835920986749.
67. Kaufmann M, Von Minckwitz G, Smith R, Valero V, Gianni L, Eiermann W, Howell A, Dan Costa S, Beuzeboc P, Untch M, et al. International expert panel on the use of primary (preoperative) systemic treatment of operable breast cancer: Review and recommendations. Vol. 21, *Journal of Clinical Oncology*. 2003. p. 2600–8.
68. Velasco Capellas M, Martínez Peralta S, Cerdà Serdà P, Estival González A, Fernández Bruno M, Lianes Barragan P. Quimioterapia neoadyuvante en el cáncer de mama localmente avanzado. *Rev Senol y Patol Mamar*. 2012;25(1):14–21.
69. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, André F, Tordai A, Mejia JA, Symmans WF, Gonzalez-Angulo AM, Hennessy B, Green M, 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.
70. Haque W, Verma V, Hatch S, Suzanne Klimberg V, Brian Butler E, Teh BS. Response rates and pathologic complete response by breast cancer molecular subtype following neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat*. 2018;170(3):559–67.
71. Symmans WF, Peintinger F, Hatzis C, Rajan R, Kuerer H, Valero V, Assad L, Poniecka A, Hennessy B, Green M, et al. Measurement of residual breast cancer burden to predict survival after neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2007;25(28):4414–22.
72. Spring LM, Fell G, Arfe A, Sharma C, Greenup R, Reynolds KL, Smith BL, Alexander B, Moy B, Isakoff SJ, et al. Pathologic Complete Response after Neoadjuvant Chemotherapy and Impact on Breast Cancer Recurrence and Survival: A Comprehensive Meta-analysis. *Clin Cancer Res*. 2020;26(12):2838–48.
73. Bear HD, Anderson S, Brown A, Smith R, Mamounas EP, Fisher B, Margoese R, Theoret H, Soran A, Lawrence Wickerham D, et al. The effect on tumor response of adding sequential preoperative docetaxel to preoperative doxorubicin and cyclophosphamide: Preliminary results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-27. *J Clin Oncol*. 2003;21(22):4165–74.
74. Evans TRJ, Yellowlees A, Foster E, Earl H, Cameron DA, Hutcheon AW, Coleman RE, Perren T, Gallagher CJ, Quigley M, et al. Phase III randomized trial of doxorubicin and docetaxel versus doxorubicin and cyclophosphamide as primary medical therapy in women with breast cancer: An Anglo-Celtic Cooperative Oncology Group Study. *J Clin Oncol*. 2005;23(13):2988–95.
75. Bear HD, Anderson S, Smith RE, Geyer CE, Mamounas EP, Fisher B, Brown AM, Robidoux A, Margoese R, Kahlenberg MS, et al. Sequential preoperative or postoperative docetaxel added to preoperative doxorubicin plus cyclophosphamide for

- operable breast cancer: National surgical adjuvant breast and bowel project protocol B-27. *J Clin Oncol.* 2006;24(13):2019–27.
76. Jones S, Holmes FA, O'Shaughnessy J, Blum JL, Vukelja SJ, McIntyre KJ, Pippen JE, Bordelon JH, Kirby RL, Sandbach J, et al. Docetaxel with cyclophosphamide is associated with an overall survival benefit compared with doxorubicin and cyclophosphamide: 7-year follow-up of us oncology research trial 9735. *J Clin Oncol.* 2009;27(8):1177–83.
77. Blum JL, Flynn PJ, Yothers G, Asmar L, Geyer CE, Jacobs SA, Robert NJ, Hopkins JO, O'Shaughnessy JA, Dang CT, et al. Anthracyclines in early breast Cancer: The ABC Trials—USOR 06-090, NSABP B-46-I/USOR 07132, and NSABP B-49 (NRG Oncology). *J Clin Oncol.* 2017;35(23):2647–55.
78. Sharma P, López-Tarruella S, García-Saenz JA, Ward C, Connor CS, Gómez HL, Prat A, Moreno F, Jerez-Gilarranz Y, Barnadas A, et al. Efficacy of neoadjuvant carboplatin plus docetaxel in triple-negative breast cancer: Combined analysis of two cohorts. *Clin Cancer Res.* 2017;23(3):649–57.
79. Sikov WM, Polley M-Y, Twohy E, Perou CM, Singh B, Berry DA, Tolane SM, Somlo G, Port ER, Ma CX, et al. CALGB (Alliance) 40603: Long-term outcomes (LTOs) after neoadjuvant chemotherapy (NACT) +/- carboplatin (Cb) and bevacizumab (Bev) in triple-negative breast cancer (TNBC). *J Clin Oncol.* 2019;40(12):1323–34.
80. Von Minckwitz G, Schneeweiss A, Loibl S, Salat C, Denkert C, Rezai M, Blohmer JU, Jackisch C, Paepke S, Gerber B, et al. Neoadjuvant carboplatin in patients with triple-negative and HER2-positive early breast cancer (GeparSixto; GBG 66): A randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2014;15(7):747–56.
81. Loibl S, Weber KE, Timms KM, Elkin EP, Hahnen E, Fasching PA, Lederer B, Denkert C, Schneeweiss A, Braun S, et al. Survival analysis of carboplatin added to an anthracycline/taxane-based neoadjuvant chemotherapy and HRD score as predictor of response—final results from GeparSixto. *Ann Oncol.* 2018;29(12):2341–7.
82. Lebert JM, Lester R, Powell E, Seal M, McCarthy J. Advances in the systemic treatment of triple-negative breast cancer. *Curr Oncol.* 2018;25(1):142–50.
83. Masuda N, Lee S-J, Ohtani S, Im Y-H, Lee E-S, Yokota I, Kuroi K, Im S-A, Park B-W, Kim S-B, et al. Adjuvant Capecitabine for Breast Cancer after Preoperative Chemotherapy. *N Engl J Med.* 2017;376(22):2147–59.
84. Lluch A, Torrecillas L, Barrios CH, Bines J, Gómez H, Getulio J, Ruiz-Borrego M, De la Haba J, Torres R, Ruiz A. Phase III Trial of Adjuvant Capecitabine After Standard Neo-/Adjuvant Chemotherapy in Patients With Early Triple-Negative Breast Cancer (GEICAM/2003-11_CIBOMA/2004-01). *J Clin Oncol.* 2020;20(38):203–13.
85. Tutt A, Kaufman B, Garber J, Gelber R, McFadden E, Goessl C, Viale G, Geyer C, Zardavas D, Arahmani A, et al. OlympiA: A randomized phase III trial of olaparib as adjuvant therapy in patients with high-risk HER2-negative breast cancer (BC) and a germline BRCA1/2 mutation (gBRCAm). *Ann Oncol.* 2017;28, Supl 5.
86. Tutt ANJ, Garber JE, Kaufman B, Viale G, Fumagalli D, Rastogi P, Gelber RD, de Azambuja E, Fielding A, Balmaña J, et al. Adjuvant Olaparib for Patients with BRCA1 - or BRCA2 -Mutated Breast Cancer . *N Engl J Med.* 2021;384(25):2394–405.
87. Geyer CE, Garber JE, Gelber RD, Yothers G, Taboada M, Ross L, Rastogi P, Cui K, Arahmani A, Aktan G, et al. Overall survival in the OlympiA phase III trial of adjuvant

- olaparib in patients with germline pathogenic variants in BRCA1/2 and high-risk, early-stage breast cancer. *N Loman*. 2022;35.
88. Loibl S, Untch M, Burchardi N, Huober J, Sinn B V., Blohmer JU, Grischke EM, Furlanetto J, Tesch H, Hanusch C, et al. A randomised phase II study investigating durvalumab in addition to an anthracycline taxane-based neoadjuvant therapy in early triple-negative breast cancer: Clinical results and biomarker analysis of GeparNuevo study. *Ann Oncol*. 2019;30(8):1279–88.
89. Schmid P, Cortes J, Pusztai L, McArthur H, Kümmel S, Bergh J, Denkert C, Park YH, Hui R, Harbeck N, et al. Pembrolizumab for Early Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2020;382(9):810–21.
90. Schmid P, Cortes J, Dent R, Pusztai L, McArthur H, Kümmel S, Bergh J, Denkert C, Park YH, Hui R, et al. VP7-2021: KEYNOTE-522: Phase III study of neoadjuvant pembrolizumab + chemotherapy vs. placebo + chemotherapy, followed by adjuvant pembrolizumab vs. placebo for early-stage TNBC. *Ann Oncol*. 2021;32(9):1998–2000.
91. Gianni L, Huang C-S, Egle D, Bermejo B, Zamagni C, Thill M, Anton A, Zambelli S, Bianchini G, Russo S, et al. Abstract GS3-04: Pathologic complete response (pCR) to neoadjuvant treatment with or without atezolizumab in triple negative, early high-risk and locally advanced breast cancer. NeoTRIPaPDL1 Michelangelo randomized study. *Ann Oncol*. 2020;33(5):534–43.
92. Goodman A. No Improved Pathologic Complete Response With Atezolizumab in Early Triple-Negative Breast Cancer. *ASCO Post*. 2020;1:1.
93. Mittendorf EA, Zhang H, Barrios CH, Saji S, Jung KH, Hegg R, Koehler A, Sohn J, Iwata H, Telli ML, 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.
94. Von Minckwitz G, Untch M, Blohmer JU, Costa SD, Eidtmann H, Fasching PA, Gerber B, Eiermann W, Hilfrich J, Huober J, et al. Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes. *J Clin Oncol*. 2012;30(15):1796–804.
95. Tresserra F, Martínez MÁ, González-Cao M, Rodríguez I, Viteri S, Baulies S, Fábregas R. Pathologic response to neoadjuvant chemotherapy: Correlation between 2 histologic grading systems. *Rev Senol y Patol Mamar*. 2013;26(3):77–84.
96. Ogston KN, Miller ID, Payne S, Hutcheon AW, Sarkar TK, Smith I, Schofield A, Heys SD. A new histological grading system to assess response of breast cancers to primary chemotherapy: Prognostic significance and survival. *Breast*. 2003;12(5):320–7.
97. Tresserra F, Martínez MÁ, González-Cao M, Rodríguez I, Viteri S, Baulies S, Fábregas R. Respuesta patológica a la quimioterapia neoadyuvante: correlación entre 2 sistemas de gradación histológica. *Rev Senol y Patol Mamar - J Breast Sci*. 2013;26(3):77–84.
98. Wang W, Liu Y, Zhang H, Zhang S, Duan X, Ye J, Xu L, Zhao J, Cheng Y, Liu Q. Prognostic value of residual cancer burden and Miller-Payne system after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *Gland Surg*. 2021;10(12):3211–21.
99. Criscitiello C, Curigliano G. Immunotherapy of Breast Cancer. *Prog tumor Res*. 2015;42:30–43.

100. Parham M. No Title. *Inmunología 2º Edición* Editorial Médica Panamericana. 2006. 1–560 p.
101. Sanz JM, Lahoz AMG, Silva A. El sistema inmune y el microambiente tumoral: componentes y función. *Med - Programa Form Médica Contin Acreditado*. 2021;13(33):1932–41.
102. Jacobo Velázquez PM, Huerta López JG, Cravioto Quintana P. Interacciones entre el cáncer y el sistema inmunológico. *Alergia, Asma e Inmunol Pediátricas*. 2017;26(2):56–63.
103. Zgura A, Galesa L, Bratila E, Anghel R. Relationship between Tumor Infiltrating Lymphocytes and Progression in Breast Cancer. *Maedica (Buchar)*. 2018;13(4):317–20.
104. Kurozumi S, Matsumoto H, Kurosumi M, Inoue K, Fujii T, Horiguchi J, Shirabe K, Oyama T, Kuwano H. Prognostic significance of tumour-infiltrating lymphocytes for oestrogen receptor-negative breast cancer without lymph node metastasis. *Oncol Lett*. 2019;17(3):2647–2656.
105. Kos Z, Roblin E, Kim RS, Michiels S, Gallas BD, Chen W, van de Vijver KK, Goel S, Adams S, Demaria S, et al. Pitfalls in assessing stromal tumor infiltrating lymphocytes (sTILs) in breast cancer. *npj Breast Cancer*. 2020;6(17).
106. Dadiani M, Necula D, Kahana-Edwin S, Oren N, Baram T, Marin I, Morzaev-Sulzbach D, Pavlovski A, Balint-Lahat N, Anafi L, et al. TNFR2+ TILs are significantly associated with improved survival in triple-negative breast cancer patients. *Cancer Immunol Immunother*. 2020;69(7):1315–26.
107. Denkert C, Von Minckwitz G, Brase JC, Sinn B V., Gade S, Kronenwett R, Pfitzner BM, Salat C, Loi S, Schmitt WD, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes and response to neoadjuvant chemotherapy with or without carboplatin in human epidermal growth factor receptor 2-positive and triple-negative primary breast cancers. *J Clin Oncol*. 2015;33(9):983–91.
108. Park JH, Jonas SF, Bataillon G, Criscitiello C, Salgado R, Loi S, Viale G, Lee HJ, Dieci M V., Kim SB, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with early-stage triple-negative breast cancers (TNBC) who did not receive adjuvant chemotherapy. *Ann Oncol*. 2019;30(12):1941–9.
109. De Jong VMT, Wang Y, Opdam M, Hoeve N ter, Józwiak K, Hauptmann M, Stathonikos N, Horlings H, Broeks A, Michiels S, et al. 159O Prognostic value of tumour infiltrating lymphocytes in young triple negative breast cancer patients who did not receive adjuvant systemic treatment; by the PARADIGM study group. *Ann Oncol*. 2020;31, Supl 4:303.
110. Matkowski R, Gisterek I, Halon A, Lacko A, Szewczyk K, Staszek U, Pudelko M, Szynglarewicz B, Szelachowska J, Zolnierek A, et al. The prognostic role of tumor-infiltrating CD4 and CD8 T lymphocytes in breast cancer. *Anticancer Res*. 2009;29(7):2445–51.
111. Yang X, Ren H, Sun Y, Shao Y, Zhang L, Li H, Zhang X, Yang X, Yu W, Fu J. Prognostic significance of CD4/CD8 ratio in patients with breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2017;10(4):4787–93.
112. Macchetti AH, Marana HRC, Silva JS, De Andrade JM, Ribeiro-Silva A, Bighetti S. Tumor-infiltrating CD4+ T lymphocytes in early breast cancer reflect lymph node involvement. *Clinics*. 2006;61(3):203–8.

113. Ali HR, Provenzano E, Dawson SJ, Blows FM, Liu B, Shah M, Earl HM, Poole CJ, Hiller L, Dunn JA, et al. Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12 439 patients. *Ann Oncol.* 2014;25(8):1536–43.
114. Mahmoud SMA, Paish EC, Powe DG, Macmillan RD, Grainge MJ, Lee AHS, Ellis IO, Green AR. Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2011;29(15):1949–55.
115. Aaltomaa S, Lipponen P, Eskelinen M, Kosma VM, Marin S, Alhava E, Syrjänen K. Lymphocyte infiltrates as a prognostic variable in female breast cancer. *Eur J Cancer.* 1992;28A(4–5):859–64.
116. Jamiyan T, Kuroda H, Yamaguchi R, Nakazato Y, Noda S, Onozaki M, Abe A, Hayashi M. Prognostic impact of a tumor-infiltrating lymphocyte subtype in triple negative cancer of the breast. *Breast Cancer.* 2020;27(5):880–92.
117. Liu F, Lang R, Zhao J, Zhang X, Pringle GA, Fan Y, Yin D, Gu F, Yao Z, Fu L. 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.
118. Decker T, Fischer G, Bücke W, Bücke P, Stotz F, Grüneberger A, Gropp-Meier M, Wiedemann G, Pfeiffer C, Peschel C, et al. Increased number of regulatory T cells (Tregs) in the peripheral blood of patients with Her-2/neu-positive early breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2012;138(11):1945–50.
119. Mahmoud SMA, Paish EC, Powe DG, MacMillan RD, Lee AHS, Ellis IO, Green AR. An evaluation of the clinical significance of FOXP3+ infiltrating cells in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;127(1):99–108.
120. Glajcar A, Szpor J, Hodorowicz-Zaniewska D, Tyrak KE, Okoń K. The composition of T cell infiltrates varies in primary invasive breast cancer of different molecular subtypes as well as according to tumor size and nodal status. *Virchows Arch.* 2019;475(1):13–23.
121. Verma C, Eremin JM, Robins A, Bennett AJ, Cowley GP, El-Sheemy MA, Jibril JA, Eremin O. Abnormal T regulatory cells (Tregs: FOXP3+, CTLA-4+), myeloid-derived suppressor cells (MDSCs: Monocytic, granulocytic) and polarised T helper cell profiles (Th1, Th2, Th17) in women with large and locally advanced breast cancers undergoing neoadjuvant ch. *J Transl Med.* 2013;11(16).
122. Tesniere A, Panaretakis T, Kepp O, Apetoh L, Ghiringhelli F, Zitvogel L, Kroemer G. Molecular characteristics of immunogenic cancer cell death. *Cell Death Differ.* 2008;15(1):3–12.
123. Sukkurwala AQ, Adjemian S, Senovilla L, Michaud M, Spaggiari S, Vacchelli E, Baracco EE, Galluzzi L, Zitvogel L, Kepp O, et al. Screening of novel immunogenic cell death inducers within the NCI mechanistic diversity set. *Oncoimmunology.* 2014;3:e28473.
124. Ghiringhelli F, Apetoh L, Tesniere A, Aymeric L, Ma Y, Ortiz C, Vermaelen K, Panaretakis T, Mignot G, Ullrich E, et al. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1B-dependent adaptive immunity against tumors. *Nat Med.* 2009;15(10):1170–8.
125. Mattarollo SR, Loi S, Duret H, Ma Y, Zitvogel L, Smyth MJ. Pivotal role of innate and adaptive immunity in anthracycline chemotherapy of established tumors. *Cancer Res.* 2011;71(14):4809–20.
126. Carson WE, Shapiro CL, Crespin TR, Thornton LM, Andersen BL. Cellular immunity in

- breast cancer patients completing taxane treatment. *Clin Cancer Res.* 2004;10(10):3401–9.
127. Chen Q, Xia R, Zheng W, Zhang L, Li P, Sun X, Shi J. Metronomic paclitaxel improves the efficacy of PD-1 monoclonal antibodies in breast cancer by transforming the tumor immune microenvironment. *Am J Transl Res.* 2020;12(2):519–530.
128. García-Romo GS, García-Castillo KG, Díaz-Rodríguez Á, Reyes-Hernández D, Pedroza-González A. Principales mecanismos inmunorreguladores que favorecen el desarrollo del cáncer de mama. *Gac Med Mex.* 2017;153(2):229–37.
129. Voutsadakis IA. Immune blockade inhibition in breast cancer. *Anticancer Res.* 2016;36(11):5607–22.
130. Muenst S, Schaerli AR, Gao F, Däster S, Trella E, Droezer RA, Muraro MG, Zajac P, Zanetti R, Gillanders WE, 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.
131. Noske A, Möbus V, Weber K, Schmatloch S, Weichert W, Köhne CH, Solbach C, Ingold Heppner B, Steiger K, Müller V, et al. Relevance of tumour-infiltrating lymphocytes, PD-1 and PD-L1 in patients with high-risk, nodal-metastasised breast cancer of the German Adjuvant Intergroup Node-positive study. *Eur J Cancer.* 2019;114:76–88.
132. Baptista MZ, Sarian LO, Derchain SFM, Pinto GA, Vassallo J. Prognostic significance of PD-L1 and PD-L2 in breast cancer. *Hum Pathol.* 2016;47(1):78–84.
133. Wen WX, Leong CO. Association of BRCA1- And BRCA2-deficiency with mutation burden, expression of PD-L1/ PD-1, immune infiltrates, and T cell-inflamed signature in breast cancer. *PLoS One.* 2019;14(4):e021.
134. Ilie M, Khambata-Ford S, Copie-Bergman C, Huang L, Juco J, Hofman V, Hofman P. Use of the 22C3 anti-PD-L1 antibody to determine PD-L1 expression in multiple automated immunohistochemistry platforms. *PLoS One.* 2017;12(10):e0186537.
135. Rimm DL, Han G, Taube JM, Yi ES, Bridge JA, Flieder DB, Homer R, West WW, Wu H, Roden AC, et al. A prospective, multi-institutional, pathologist-based assessment of 4 immunohistochemistry assays for PD-L1 expression in non-small cell lung cancer. *JAMA Oncol.* 2017;3(8):1051–8.
136. Cyprian FS, Akhtar S, Gatalica Z, Vranic S. Targeted immunotherapy with a checkpoint inhibitor in combination with chemotherapy: A new clinical paradigm in the treatment of triple-negative breast cancer. *Bosn J Basic Med Sci.* 2019;19(3):227–33.
137. Kassardjian A, Shintaku PI, Moatamed NA. Expression of immune checkpoint regulators, cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) and programmed death-ligand 1 (PD-L1), in female breast carcinomas. *PLoS One.* 2018;13(4):e019.
138. Peng Z, Su P, Yang Y, Yao X, Zhang Y, Jin F, Yang B. 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.
139. Pervan M, Bräutigam K, Thorns C, Rody A, Liedtke C. Immune checkpoint marker expression and clinicopathological factors in primary TNBC. *J Clin Oncol.* 2018;2:1–18.
140. Marra A, Viale G, Curigliano G. Recent advances in triple negative breast cancer: The immunotherapy era. *BMC Med.* 2019;17(1):90.

141. Garrido-Castro AC, Lin NU, Polyak K. Insights into molecular classifications of triple-negative breast cancer: Improving patient selection for treatment. *Cancer Discov.* 2019;9(2):176–98.
142. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science* (80-). 2013;339(6127):1546–58.
143. The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumors - The Cancer Genome Atlas Network. Supplementary information. *Nature.* 2012;490:61–70.
144. Pereira B, Chin SF, Rueda OM, Vollan HKM, Provenzano E, Bardwell HA, Pugh M, Jones L, Russell R, Sammut SJ, et al. The somatic mutation profiles of 2,433 breast cancers refines their genomic and transcriptomic landscapes. *Nat Commun.* 2016;10(7):11479.
145. Weisman PS, Ng CKY, Brogi E, Eisenberg RE, Won HH, Piscuoglio S, De Filippo MR, Ioris R, Akram M, Norton L, et al. Genetic alterations of triple negative breast cancer by targeted next-generation sequencing and correlation with tumor morphology. *Mod Pathol.* 2016;29(5):476–88.
146. Balko JM, Giltane JM, Wang K, Schwarz LJ, Young CD, Cook RS, Owens P, Sanders ME, Kuba MG, Sánchez V, 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.
147. Nik-Zainal S, Davies H, Staaf J, Ramakrishna M, Glodzik D, Zou X, Martincorena I, Alexandrov LB, Martin S, Wedge DC, et al. Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. *Nature.* 2016;534(7605):47–54.
148. Quintela Senra D, Senra Varela A. La proteína p53 y el cáncer de mama. Revisión crítica. *Rev Senol y Patol Mamar.* 2001;14(2):71–7.
149. Peng L, Xu T, Long T, Zuo H. Association between BRCA status and P53 status in breast cancer: A meta-analysis. *Med Sci Monit.* 2016;22:1939–45.
150. Bonnefoi H, Piccart M, Bogaerts J, Mauriac L, Fumoleau P, Brain E, Petit T, Rouanet P, Jassem J, Blot E, et al. TP53 status for prediction of sensitivity to taxane versus non-taxane neoadjuvant chemotherapy in breast cancer (EORTC 10994/BIG 1-00): A randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2011;12(6):527–39.
151. Darb-Esfahani S, Denkert C, Stenzinger A, Salat C, Sinn B, Schem C, Endris V, Klare P, Schmitt W, Blohmer JU, et al. Role of TP53 mutations in triple negative and HER2-positive breast cancer treated with neoadjuvant anthracycline/taxanebased chemotherapy. *Oncotarget.* 2016;18(7):67686–98.
152. Chen H, Wu J, Zhang Z, Tang Y, Li X, Liu S, Cao S, Li X. Association between BRCA status and triple-negative breast cancer: A meta-analysis. *Front Pharmacol.* 2018;9(909).
153. Pascual J, Turner NC. Targeting the PI3-kinase pathway in triple-negative breast cancer. *Ann Oncol.* 2019;30(7):1051–60.
154. Duncan JS, Whittle MC, Nakamura K, Abell AN, Midland AA, Zawistowski JS, Johnson NL, Granger DA, Jordan NV, Darr DB, et al. Dynamic reprogramming of the kinome in response to targeted MEK inhibition in triple-negative breast cancer. *Cell.* 2012;149(2):307–21.
155. Nabholz JM, Abrial C, Mouret-Reynier MA, Dauplat MM, Weber B, Gligorov J, Forest

- AM, Tredan O, Vanlemmens L, Petit T, et al. Multicentric neoadjuvant phase II study of panitumumab combined with an anthracycline/taxane based chemotherapy in operable triple negative breast cancer: Identification of biologically-defined signatures predicting treatment impact. *Ann Oncol.* 2014;25(8):1570–7.
156. Horiuchi D, Kusdra L, Huskey NE, Chandriani S, Lenburg ME, Gonzalez-Angulo AM, Creasman KJ, Bazarov A V., Smyth JW, Davis SE, et al. MYC pathway activation in triple-negative breast cancer is synthetic lethal with CDK inhibition. *J Exp Med.* 2012;209(4):679–96.
157. Yadav BS, Chanana P, Jhamb S. Biomarkers in triple negative breast cancer: A review. *World J Clin Oncol.* 2015;6(6):252–63.
158. Sharpe R, Pearson A, Herrera-Abreu MT, Johnson D, Mackay A, Welti JC, Natrajan R, Reynolds AR, Reis-Filho JS, Ashworth A, et al. FGFR signaling promotes the growth of triple-negative and basal-like breast cancer cell lines both in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res.* 2011;17(16):5275–86.
159. Modi S, Jacot W, Yamashita T, Sohn J, Vidal M, Tokunaga E, Tsurutani J, Ueno NT, Prat A, Chae YS, et al. Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-Low Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2022;387(1):9–20.
160. Van Den Ende NS, Smid M, Timmermans A, Van Brakel JB, Hansum T, Foekens R, Trapman AMAC, Heemskerk-Gerritsen BAM, Jager A, Martens JWM, et al. HER2-low breast cancer shows a lower immune response compared to HER2-negative cases. *Sci Rep.* 2022;12(12974).
161. Gampenrieder SP, Rinnerthaler G, Tinchon C, Petzer A, Balic M, Heibl S, Schmitt C, Zabernigg AF, Egle D, Sandholzer M, et al. Landscape of HER2-low metastatic breast cancer (MBC): results from the Austrian AGMT_MBC-Registry. *Breast Cancer Res.* 2021;23(1):1–9.
162. de Moura Leite L, Cesca MG, Tavares MC, Santana DM, Saldanha EF, Guimarães PT, Sá DDS, Simões MFE, Viana RL, Rocha FG, et al. HER2-low status and response to neoadjuvant chemotherapy in HER2 negative early breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2021;190(1):155–63.
163. Fasoulakis Z, Kolios G, Papamanolis V, Kontomanolis EN. Interleukins Associated with Breast Cancer. *Cureus.* 2018;10(11): e3549.
164. Liu Z, Li M, Jiang Z, Wang X. A Comprehensive Immunologic Portrait of Triple-Negative Breast Cancer. *Transl Oncol.* 2018;11(2):311–29.
165. Singh S, Kumar S, Srivastava RK, Nandi A, Thacker G, Murali H, Kim S, Baldeon M, Tobias J, Blanco MA, et al. Loss of ELF5–FBXW7 stabilizes IFNGR1 to promote the growth and metastasis of triple-negative breast cancer through interferon- γ signalling. *Nat Cell Biol.* 2020;22(5):591–602.
166. Cai X, Cao C, Li J, Chen F, Zhang S, Liu B, Zhang W, Zhang X, Ye L. Inflammatory factor TNF- α promotes the growth of breast cancer via the positive feedback loop of TNFR1/NF- κ B (and/or p38)/p-STAT3/HBXIP/TNFR1. *Oncotarget.* 2017;8(35):58338–52.
167. Ma Y, Ren Y, Dai ZJ, Wu CJ, Ji YH, Xu J. IL-6, IL-8 and TNF- α levels correlate with disease stage in breast cancer patients. *Adv Clin Exp Med.* 2017;26(3):421–6.
168. Eubank TD, Roberts RD, Khan M, Curry JM, Nuovo GJ, Kuppusamy P, Marsh CB. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor inhibits breast cancer growth and

- metastasis by invoking an anti-angiogenic program in tumor-educated macrophages. *Cancer Res.* 2009;69(5):2133–40.
169. Ding MJ, Su K, Cui GZ, Yang WH, Chen L, Yang M, Liu YQ, Dai DL. Association between transforming growth factor- β 1 expression and the clinical features of triple negative breast cancer. *Oncol Lett.* 2016;11(6):4040–4.
170. Gu D, Ao X, Yang Y, Chen Z, Xu X. Soluble immune checkpoints in cancer: Production, function and biological significance. *J Immunother Cancer.* 2018;6(1):132.
171. Palmirotta R, Lovero D, Cafforio P, Felici C, Mannavola F, Pellè E, Quaresmini D, Tucci M, Silvestris F. Liquid biopsy of cancer: a multimodal diagnostic tool in clinical oncology. Vol. 10:1758835918794630, *Therapeutic Advances in Medical Oncology.* 2018.
172. Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, Bartlett BR, Wang H, Luber B, Alani RM, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med.* 2014;6(224):224ra24.
173. Shang M, Chang C, Pei Y, Guan Y, Chang J, Li HH. Potential management of circulating tumor DNA as a biomarker in triple-negative breast cancer. Vol. 9, *Journal of Cancer.* 2018. p. 4627–34.
174. Ritter A, Hirschfeld M, Berner K, Rücker G, Jäger M, Weiss D, Medl M, Nöthling C, Gassner S, Asberger J, et al. Circulating non-coding RNA-biomarker potential in neoadjuvant chemotherapy of triple negative breast cancer? Vol. 56, *International Journal of Oncology.* 2020. p. 47–68.
175. Saliou A, Bidard FC, Lantz O, Stern MH, Vincent-Salomon A, Proudhon C, Pierga JY. Circulating tumor DNA for triple-negative breast cancer diagnosis and treatment decisions. Vol. 16, *Expert Review of Molecular Diagnostics.* 2016. p. 39–50.
176. Garcia-Murillas I, Chopra N, Comino-Méndez I, Beaney M, Tovey H, Cutts RJ, Swift C, Kriplani D, Afentakis M, Hrebien S, et al. Assessment of Molecular Relapse Detection in Early-Stage Breast Cancer. *JAMA Oncol.* 2019;5(10):1473–8.
177. Chitkara G, Hawaldar R, Badwe RA. Clinical Benefit of Circulating Tumor DNA Analysis in Early-Stage Breast Cancer. Vol. 6, *JAMA Oncology.* 2020. p. 439.
178. Papakonstantinou A, Gonzalez NS, Pimentel I, Suñol A, Zamora E, Ortiz C, Espinosa-Bravo M, Peg V, Vivancos A, Saura C, et al. Prognostic value of ctDNA detection in patients with early breast cancer undergoing neoadjuvant therapy: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev.* 2022;0(0):102362.
179. Osako T, Iwase T, Kimura K, Horii R, Akiyama F. Sentinel node tumour burden quantified based on cytokeratin 19 mRNA copy number predicts non-sentinel node metastases in breast cancer: Molecular whole-node analysis of all removed nodes. *Eur J Cancer.* 2013;49(6):1187–95.
180. Merck KGaA. MILLIPLEX® Human High Sensitivity T Cell Magnetic Bead Panel 96-Well Plate Assay. In *American Society of Clinical Oncology*; 2022. p. 1–32.
181. Balkenhol MCA, Vreuls W, Wauters CAP, Mol SJJ, van der Laak JAWM, Bult P. Histological subtypes in triple negative breast cancer are associated with specific information on survival. *Ann Diagn Pathol.* 2020;46:151490.
182. Soares RF, Garcia AR, Monteiro AR, Macedo F, Pereira TC, Carvalho JC, Pego A, Mariano M, Madeira P, Pova S, et al. Prognostic factors for early relapse in non-

- metastatic triple negative breast cancer — real world data. *Reports Pract Oncol Radiother.* 2021;26(4):563.
183. Tečić Vuger A, Šeparović R, Vazdar L, Pavlović M, Lepetić P, Šitić S, Bajić Ž, Šarčević B, Vrbaneć D. Characteristics and prognosis of triple-negative breast cancer patients: a croatian single institution retrospective cohort study. *Acta Clin Croat.* 2020;59(1):97–108.
184. Urru SAM, Gallus S, Bosetti C, Moi T, Medda R, Sollai E, Murgia A, Sanges F, Pira G, Manca A, et al. Clinical and pathological factors influencing survival in a large cohort of triple-negative breast cancer patients. *BMC Cancer.* 2018;18(1).
185. Martín M, Barrios C, Torrecillas L, Ruiz-Borrego M, Bines J, Segalla J, Ruiz A, García-Sáenz J, Torres R, de la Haba J, et al. Abstract GS2-04: Efficacy results from CIBOMA/2004-01_GEICAM/2003-11 study: A randomized phase III trial assessing adjuvant capecitabine after standard chemotherapy for patients with early triple negative breast cancer. *J Clin Oncol.* 2019;38(3):203–13.
186. Wang X, Wang S-S, Huang H, Cai L, Peng R-J, Zhao L, Lin Y, Zeng J, Zhang L-H, Ke Y-L, et al. Phase III trial of metronomic capecitabine maintenance after standard treatment in operable triple-negative breast cancer (SYSUCC-001). *J Clin Oncol.* 2020;12(9):5023–39.
187. Sharma P, Kimler BF, O’Dea A, Nye LE, Wang YY, Yoder R, Prochaska LH, Wagner JL, Amin AL, Larson K, et al. Results of randomized phase II trial of neoadjuvant carboplatin plus docetaxel or carboplatin plus paclitaxel followed by AC in stage I-III triple-negative breast cancer (NCT02413320). *J Clin Oncol.* 2019;37:15_suppl:516–516.
188. Poggio F, Bruzzzone M, Ceppi M, Pondé NF, La Valle G, Del Mastro L, De Azambuja E, Lambertini M. Platinum-based neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer: A systematic review and meta-analysis. Vol. 29, *Annals of Oncology.* 2018. p. 1497–508.
189. Brumec M, Sobočan M, Takač I, Arko D. Clinical Implications of Androgen-Positive Triple-Negative Breast Cancer. *Cancers (Basel).* 2021;13(7).
190. Gerson-Cwilich R, Alban-de la Torre LF, Villalobos-Prieto A, Padilla-Rodríguez ÁL, Serrano-Olvera JA. Recurrencia y supervivencia en cáncer de mama temprano en relación a la expresión de Ki-67. *Gac Mex Oncol.* 2014;13(1):4–11.
191. Zhou Q, Li W. Prognostic value of Ki-67 in patients with triple-negative breast cancer receiving neo-adjuvant or adjuvant chemotherapy: A systematic review and meta-analysis. *Ann Oncol.* 2019;30:iii15.
192. Zhu X, Chen L, Huang B, Wang Y, Ji L, Wu J, Di G, Liu G, Yu K, Shao Z, et al. The prognostic and predictive potential of Ki-67 in triple-negative breast cancer. *Sci Reports* 2020 101. 2020;10(1):1–10.
193. Hashmi AA, Naz S, Hashmi SK, Irfan M, Hussain ZF, Khan EY, Asif H, Faridi N. Epidermal growth factor receptor (EGFR) overexpression in triple-negative breast cancer: association with clinicopathologic features and prognostic parameters. *Surg Exp Pathol* 2019 21. 2019;2(1):1–7.
194. Ferraro DA, Gaborit N, Maron R, Cohen-Dvashi H, Porat Z, Pareja F, Lavi S, Lindzen M, Ben-Chetrit N, Sela M, et al. Inhibition of triple-negative breast cancer models by combinations of antibodies to EGFR. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(5):1815–20.
195. Hachem G El. EGFR inhibition in metastatic triple negative breast cancer: a losing

- target. *Int Clin Pathol J*. 2018;Volume 6(Issue 3).
196. Gerratana L, Basile D, Buono G, De Placido S, Giuliano M, Minichillo S, Coinu A, Martorana F, De Santo I, Del Mastro L, et al. Androgen receptor in triple negative breast cancer: A potential target for the targetless subtype. *Cancer Treat Rev*. 2018;68:102–10.
197. Hickey TE, Robinson JLL, Carroll JS, Tilley WD. Minireview: The Androgen Receptor in Breast Tissues: Growth Inhibitor, Tumor Suppressor, Oncogene? *Mol Endocrinol*. 2012;26(8):1252–67.
198. Tavares MC, Sampaio CD, Lima GE, Andrade VP, Gonçalves DG, Macedo MP, Cordeiro de Lima VC. A high CD8 to FOXP3 ratio in the tumor stroma and expression of PTEN in tumor cells are associated with improved survival in non-metastatic triple-negative breast carcinoma. *BMC Cancer*. 2021;21(1):1–12.
199. Matsumoto H, Thike AA, Li H, Yeong J, Koo SL, Dent RA, Tan PH, Iqbal J. Increased CD4 and CD8-positive T cell infiltrate signifies good prognosis in a subset of triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2016;156(2):237–47.
200. Bikfalvi A, Billottet C. The CC and CXC chemokines: Major regulators of tumor progression and the tumor microenvironment. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 2020;318(3).
201. Nazari A, Ahmadi Z, Hassanshahi G, Abbasifard M, Taghipour Z, Falahati-Pour SK, Khorramdelazad H. Effective Treatments for Bladder Cancer Affecting CXCL9/CXCL10/CXCL11/CXCR3 Axis: A Review. *Oman Med J*. 2020;35(2):e103.
202. Kistner L, Doll D, Holtorf A, Nitsche U, Janssen K-P, Kistner L, Doll D, Holtorf A, Nitsche U, Janssen K-P. Interferon-inducible CXC-chemokines are crucial immune modulators and survival predictors in colorectal cancer. *Oncotarget*. 2017;8(52):89998–90012.
203. Esteban E, Exposito F, Crespo G, Lambea J, Pinto A, Puente J, Arranz JA, Redrado M, Rodriguez-Antona C, de Andrea C, et al. Circulating levels of the interferon- γ -regulated chemokines cxcl10/cxcl11, il-6 and hgf predict outcome in metastatic renal cell carcinoma patients treated with antiangiogenic therapy. *Cancers (Basel)*. 2021;13(11):2849.
204. Hamilton JA. GM-CSF as a target in inflammatory/autoimmune disease: current evidence and future therapeutic potential. *Expert Rev Clin Immunol*. 2015;11(4):457–65.
205. Hong IS. Stimulatory versus suppressive effects of GM-CSF on tumor progression in multiple cancer types. *Exp Mol Med*. 2016;48(7):e242.
206. Liu L, Liu Y, Yan X, Zhou C, Xiong X. The role of granulocyte colony-stimulating factor in breast cancer development: A review. *Mol Med Rep*. 2020;21(5):2019–29.
207. Sławomir Ławicki, Małgorzata Czygier, Jacek Omyła, Ewa Bedkowska MS. [The plasma levels of granulocyte-colony stimulating factor and granulocyte-macrophage colony stimulating factor in breast cancer patients] - PubMed. *Przegl Lek*. 2010;67(3):184–6.
208. Aapro M, Crawford J, Kamioner D. Prophylaxis of chemotherapy-induced febrile neutropenia with granulocyte colony-stimulating factors: where are we now? *Support Care Cancer*. 2010;18:529–541.
209. White GE, Greaves DR. Fractalkine: A Survivor's Guide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(3):589–94.

210. Korbecki J, Simińska D, Kojder K, Grochans S, Gutowska I, Chlubek D, Baranowska-Bosiacka I. Fractalkine/CX3CL1 in Neoplastic Processes. *Int J Mol Sci.* 2020;21(10).
211. Jorgovanovic D, Song M, Wang L, Zhang Y. Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: a review. *Biomark Res.* 2020;8(49):1–16.
212. Granqvist V, Holmgren C, Larsson C. Induction of interferon- β and interferon signaling by TRAIL and Smac mimetics via caspase-8 in breast cancer cells. *PLoS One.* 2021;16(3).
213. Geerts D, Murdaca G, Griguolo G, Schillaci R, Mercogliano MF, Bruni S, Elizalde P V. Tumor Necrosis Factor α Blockade: An Opportunity to Tackle Breast Cancer. *Front Oncol* | www.frontiersin.org. 2020;1:584.
214. Wolczyk D, Zaremba-Czogalla M, Hryniewicz-Jankowska A, Tabola R, Grabowski K, Sikorski AF, Augoff K. TNF- α promotes breast cancer cell migration and enhances the concentration of membrane-associated proteases in lipid rafts. *Cell Oncol.* 2016;39(4):353–63.
215. Dong R, Zhang M, Hu Q, Zheng S, Soh A, Zheng Y, Yuan H. Galectin-3 as a novel biomarker for disease diagnosis and a target for therapy (Review). Vol. 41, *International Journal of Molecular Medicine*. Spandidos Publications; 2018. p. 599–614.
216. Torres-Martínez S, Calabuig-Fariñas S, Moreno-Manuel A, Bertolini G, Herreros-Pomares A, Escorihuela E, Duréndez-Saéz E, Guijarro R, Blasco A, Roz L, et al. Soluble galectin-3 as a microenvironment-relevant immunoregulator with prognostic and predictive value in lung adenocarcinoma. *Mol Oncol.* 2023;1–50.
217. Blair BB, Funkhouser AT, Goodwin JL, Strigenz AM, Chaballout BH, Martin JC, Arthur CM, Funk CR, Edenfield WJ, Blenda A V, et al. Increased Circulating Levels of Galectin Proteins in Patients with Breast, Colon, and Lung Cancer. *Cancers (Basel).* 2021;13(19):4819.
218. Barrow H, Guo X, Wandall HH, Pedersen JW, Fu B, Zhao Q, Chen C, Rhodes JM, Yu LG. Serum galectin-2, -4, and -8 are greatly increased in colon and breast cancer patients and promote cancer cell adhesion to blood vascular endothelium. *Clin Cancer Res.* 2011;17(22):7035–46.
219. Niang DGM, Ka S, Hendricks J, Diouf D, Gaba FM, Diouf A, Diop M, Mbow M, Faye B, Diallo RN, et al. Profile of Plasma Galectin-3 Concentrations, Inflammatory Cytokines Levels and Lymphocytes Status in Breast Cancer under Chemotherapy. *Open J Immunol.* 2022;12(1):1–14.
220. Topcu TO, Kavgaci H, Gunaldi M, Kocoglu H, Akyol M, Mentese A, Yaman SO, Orem A, Ozdemir F, Aydin F. The clinical importance of serum galectin-3 levels in breast cancer patients with and without metastasis. *J Cancer Res Ther.* 2018;14(10):583.
221. Shafiq A, Moore J, Suleman A, Faiz S, Farooq O, Arshad A, Tehseen M, Zafar A, Ali SH, Din NU, et al. Elevated Soluble Galectin-3 as a Marker of Chemotherapy Efficacy in Breast Cancer Patients: A Prospective Study. *Int J Breast Cancer.* 2020;4824813.
222. De Iuliis F, Salerno G, Taglieri L, Lanza R, Cardelli P, Scarpa S. Circulating neuregulin-1 and galectin-3 can be prognostic markers in breast cancer. *Int J Biol Markers.* 2017;32(3):333–6.
223. Song YK, Billiar TR, Lee YJ. Role of galectin-3 in breast cancer metastasis: involvement of nitric oxide. *Am J Pathol.* 2002;160(3):1069–75.

224. Pereira JX, Dos Santos SN, Pereira TC, Cabanel M, Chammas R, De Oliveira FL, Bernardes ES, El-Cheikh MC. Galectin-3 Regulates the Expression of Tumor Glycosaminoglycans and Increases the Metastatic Potential of Breast Cancer. *J Oncol*. 2019;2019:9827147.
225. Iwata T, Tanaka K, Inoue Y, Toiyama Y, Hiro J, Fujikawa H, Okugawa Y, Uchida K, Mohri Y, Kusunoki M. Macrophage inflammatory protein-3 alpha (MIP-3a) Is a novel serum prognostic marker in patients with colorectal cancer. *J Surg Oncol*. 2013;107(2):160–6.
226. Zhang X, Meng A, Wang H, Yan X. High serum macrophage inflammatory protein-3 α is associated with the early recurrence or metastasis of non-small cell lung cancer following primary pulmonary resection. *Oncol Lett*. 2014;8(2):948–52.
227. Tang M, Ou N, Li C, Lu A, Li J, Ma L, Zhong W, Gao J, Zheng Y, Cai Y. Expression and Prognostic Significance of Macrophage Inflammatory Protein-3 Alpha and Cystatin A in Nasopharyngeal Carcinoma. *Biomed Res Int*. 2015;1–6.
228. Wong LC, Wong O, Laterza OF, Zhao X. Abstract 1573: A clinical biomarker assay to quantitate MIP-1a in human serum. *Cancer Res*. 2018;78(13_Supplement):1573–1573.
229. Ma X, Su J, Zhao S, He Y, Li S, Yang X, Zhai S, Rong S, Zhang X, Xu G, et al. CCL3 Promotes Proliferation of Colorectal Cancer Related with TRAF6/NF- κ B Molecular Pathway. *Contrast Media Mol Imaging*. 2022;12:2022:23:1–19.
230. Chavey C, Bibeau F, Gourgou-Bourgade S, Burlinchon S, Boissière F, Laune D, Roques S, Lazenec G. Oestrogen receptor negative breast cancers exhibit high cytokine content. *Breast Cancer Res*. 2007;9(1):1–11.
231. Brocker C, Thompson D, Matsumoto A, Nebert DW, Vasiliou V. Evolutionary divergence and functions of the human interleukin (IL) gene family. *Hum Genomics*. 2010;5(1):30.
232. Kozłowski L, Zakrzewska I, Tokajuk P WM. Concentration of interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) and interleukin-10 (IL-10) in blood serum of breast cancer patients - PubMed. *Rocz Akad Med Białymst*. 2003;48:82–4.
233. Benoy IH, Salgado R, Dam P Van, Geboers K, Marck E Van, Scharpé S, Vermeulen PB, Dirix LY. Increased Serum Interleukin-8 in Patients with Early and Metastatic Breast Cancer Correlates with Early Dissemination and Survival. *Clin Cancer Res*. 2004;10:7157–7162.
234. Sheikhpour E, Noorbakhsh P, Foroughi E, Farahnak S, Nasiri R, Neamatzadeh H. A Survey on the Role of Interleukin-10 in Breast Cancer: A Narrative. *Reports Biochem Mol Biol*. 2018;7(1):30–7.
235. Zhao Z, Wang L, Xu W. IL-13R α 2 mediates PNR-induced migration and metastasis in ER α -negative breast cancer. *Oncogene*. 2015;34(12):1596–607.
236. Song X, Wei C, Li X. The potential role and status of IL-17 family cytokines in breast cancer. *Int Immunopharmacol*. 2021;95:107544.
237. Liu G, Chen XT, Zhang H, Chen X. Expression analysis of cytokines IL-5, IL-6, IL-8, IL-17 and VEGF in breast cancer patients. *Front Oncol*. 2022;12:1019247.
238. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Publ Gr*. 2012;12:252–64.

239. Khan M, Zhao Z, Arooj S, Fu Y, Liao G. Soluble PD-1: Predictive, Prognostic, and Therapeutic Value for Cancer Immunotherapy. *Front Immunol.* 2020;11:1–16.
240. Li X, Du H, Zhan S, Liu W, Wang Z, Lan J, PuYang L, Wan Y, Qu Q, Wang S, et al. The interaction between the soluble programmed death ligand-1 (sPD-L1) and PD-1+ regulator B cells mediates immunosuppression in triple-negative breast cancer. *Front Immunol.* 2022;13:830606.
241. Zhu X, Lang J. Soluble PD-1 and PD-L1: Predictive and prognostic significance in cancer. Vol. 8, *Oncotarget.* 2017. p. 97671–82.
242. Asanuma K, Nakamura T, Hayashi A, Okamoto T, Iino T, Asanuma Y, Hagi T, Kita K, Nakamura K, Sudo A. Soluble programmed death-ligand 1 rather than PD-L1 on tumor cells effectively predicts metastasis and prognosis in soft tissue sarcomas. *Sci Rep.* 2020;10(9077).
243. Khan M, Zhao Z, Arooj S, Fu Y, Liao G. Soluble PD-1: Predictive, Prognostic, and Therapeutic Value for Cancer Immunotherapy. Vol. 11, *Frontiers in Immunology.* 2020. p. 1–16.
244. Li Y, Cui X, Yang YJ, Chen QQ, Zhong L, Zhang T, Cai RL, Miao JY, Yu SC, Zhang F. Serum sPD-1 and sPD-L1 as Biomarkers for Evaluating the Efficacy of Neoadjuvant Chemotherapy in Triple-Negative Breast Cancer Patients. *Clin Breast Cancer.* 2019;19(5):326-332.e1.
245. Ohkuma R, Ieguchi K, Watanabe M, Takayanagi D, Goshima T, Onoue R, Hamada K, Kubota Y, Horiike A, Ishiguro T, et al. Increased Plasma Soluble PD-1 Concentration Correlates with Disease Progression in Patients with Cancer Treated with Anti-PD-1 Antibodies. *Biomedicines.* 2021;9(12).
246. Han B, Dong L, Zhou J, Yang Y, Guo J, Xuan Q, Gao K, Xu Z, Lei W, Wang J, et al. The clinical implication of soluble PD-L1 (sPD-L1) in patients with breast cancer and its biological function in regulating the function of T lymphocyte. *Cancer Immunol Immunother.* 2021;70(10):2893–909.
247. Yazdanpanah P, Alavianmehr A, Ghaderi A, Monabati A, Montazer M, Tahmasbi K, Farjadian S. PD-L1 expression in tumor lesions and soluble PD-L1 serum levels in patients with breast cancer: TNBC versus TPBC. *Breast Dis.* 2021;40(1):43–50.
248. Chervoneva I, Peck AR, Sun Y, Yi M, Udhane SS, Langenheilm JF, Gironde MA, Jorns JM, Chaudhary LN, Kamaraju S, et al. High PD-L2 Predicts Early Recurrence of ER-Positive Breast Cancer. *JCO Precis Oncol.* 2023;7(7):e2100498.
249. Wu W, Xia X, Cheng C, Niu L, Wu J, Qian Y. Serum Soluble PD-L1, PD-L2, and B7-H5 as Potential Diagnostic Biomarkers of Human Pancreatic Cancer. *Clin Lab.* 2021;67(6):1512–9.
250. Erfani N, Razmkhah M, Ghaderi A. Circulating Soluble CTLA4 (sCTLA4) Is Elevated in Patients With Breast Cancer. *Clin Transl Ther.* 2010;28(8):828–32.
251. Isitmangil G, Gurleyik g, Aker FV, Coskun C, K ucukhuseyin O, Arikan S, Turan S, Talu C, Dogan MB, Farooqi AA YI. Association of CTLA4 and CD28 Gene Variants and Circulating Levels of Their Proteins in Patients with Breast Cancer. *In Vivo (Brooklyn).* 2016;30:485–94.
252. Vandenborre K, Van Gool SW, Kasran A, Ceuppens JL, Boogaerts MA, Vandenbergh P. Interaction of CTLA-4 (CD152) with CD80 or CD86 inhibits human T-cell activation. *Immunology.* 1999;98(3):413–21.

253. Haile ST, Horn LA, Ostrand-Rosenberg S. A soluble form of CD80 enhances antitumor immunity by neutralizing programmed death ligand-1 and simultaneously providing costimulation. *Cancer Immunol Res.* 2014;2(7):610–5.
254. Ishibashi M, Kinoshita R, Inokuchi K, Handa H, Sasaki M, Komatsu N, Imai Y, Hiroike N, Tanaka J, Tanosaki S, et al. Serum Soluble CD86, Still a Prognostic Factor in the Novel Agent Era in Multiple Myeloma Patients, Is Produced By Myeloma Cells with High CD86 Variant 3 Expression. *Blood.* 2019;134(Supplement_1):4361–4361.
255. Hock BD, McKenzie JL, Patton WN, Haring LF, Yang Y, Shen Y, Estey EH, Albitar M. The clinical significance of soluble CD86 levels in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Cancer.* 2003;98(8):1681–8.
256. Rapoport BL, Steel H, Smit T, Heyman L, Theron A, Hlatwayo NN, Kwofie L, Jooste L, Benn CA, Nayler S, et al. 37P Dysregulation of soluble immune checkpoint proteins in newly diagnosed early breast cancer patients. *Ann Oncol.* 2020;31:S1228.
257. Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, Sivertsson Å, Kampf C, Sjöstedt E, Asplund A, et al. Tissue-based map of the human proteome. *Science (80-).* 2015;347(6220).
258. Faget J, Sisirak V, Blay JY, Caux C, Bendriss-Vermare N, Ménétrier-Caux C. ICOS is associated with poor prognosis in breast cancer as it promotes the amplification of immunosuppressive CD4+ T cells by plasmacytoid dendritic cells. *Oncoimmunology.* 2013;2(3).
259. Chakrabarti R, Kapse B, Mukherjee G. Soluble immune checkpoint molecules: Serum markers for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Rep.* 2019;2(4).
260. Goldberg M V., Drake CG. LAG-3 in Cancer Immunotherapy. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2011;344:269.
261. Chocarro L, Blanco E, Zuazo M, Arasanz H, Bocanegra A, Fernández-Rubio L, Morente P, Fernández-Hinojal G, Echaide M, Garnica M, et al. Understanding LAG-3 Signaling. *Int J Mol Sci.* 2021;22(10).
262. Botticelli A, Zizzari IG, Scagnoli S, Pomati G, Strigari L, Cirillo A, Cerbelli B, Di Filippo A, Napoletano C, Scirocchi F, et al. The Role of Soluble LAG3 and Soluble Immune Checkpoints Profile in Advanced Head and Neck Cancer: A Pilot Study. *J Pers Med.* 2021;11(7).
263. Li N, Jilisihan B, Wang W, Tang Y, Keyoumu S. Soluble LAG3 acts as a potential prognostic marker of gastric cancer and its positive correlation with CD8+T cell frequency and secretion of IL-12 and INF- γ in peripheral blood. *Cancer Biomark.* 2018;23(3):341–51.
264. Huo JL, Wang YT, Fu WJ, Lu N, Liu ZS. The promising immune checkpoint LAG-3 in cancer immunotherapy: from basic research to clinical application. *Front Immunol.* 2022;13:4133.
265. Li F, Li N, Sang J, Fan X, Deng H, Zhang X, Han Q, Lv Y, Liu Z. Highly elevated soluble Tim-3 levels correlate with increased hepatocellular carcinoma risk and poor survival of hepatocellular carcinoma patients in chronic hepatitis B virus infection. *Cancer Manag Res.* 2018;10:941–51.
266. Bailly C, Thuru X, Goossens L, Goossens JF. Soluble TIM-3 as a biomarker of progression and therapeutic response in cancers and other of human diseases. *Biochem Pharmacol.* 2023;209:115445.

267. Harding JJ, Moreno V, Bang YJ, Hong MH, Patnaik A, Trigo J, Szpurka AM, Yamamoto N, Doi T, Fu S, et al. Blocking TIM-3 in Treatment-refractory Advanced Solid Tumors: A Phase Ia/b Study of LY3321367 with or without an Anti-PD-L1 Antibody. *Clin Cancer Res.* 2021;27(8):2168–78.
268. Herrero MJ. ABC de los «Toll-like receptors»: relación con el desarrollo y progresión de enfermedades autoinmunes. *Semin la Fund Española Reumatol.* 2010;11(4):135–43.
269. El-Kharashy G, Gowily A, Okda T, Houssen M. Association between serum soluble Toll-like receptor 2 and 4 and the risk of breast cancer. *Mol Clin Oncol.* 2021;14(2):1–8.
270. Gonzalez LC, Loyet KM, Calemme-Fenau J, Chauhan V, Wranik B, Ouyang W, Eaton DL. A coreceptor interaction between the CD28 and TNF receptor family members B and T lymphocyte attenuator and herpesvirus entry mediator. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(4):116–24.
271. Javadzadeh SM, Tehrani M, Keykhosravi M, Mohammadian-Amiri R, Amjadi O, Hafezi N, Zaboli E, Montazeriun M, Ajami A. Can we consider soluble herpes virus entry mediator (sHVEM) as a tumor marker? *Casp J Intern Med.* 2022;13(4):693–8.
272. Huang J, Jochems C, Anderson AM, Talaie T, Jales A, Madan RA, Hodge JW, Tsang KY, Liewehr DJ, Steinberg SM, et al. Soluble CD27-pool in humans may contribute to T-cell activation and tumor immunity. *J Immunol.* 2013;190(12):6250.
273. Kashima J, Okuma Y, Hosomi Y, Hishima T. High Serum Soluble CD27 Level Correlates with Poor Performance Status and Reduced Survival in Patients with Advanced Lung Cancer. *Oncology.* 2019;97(6):365–72.
274. Nocentini G, Riccardi C. GITR: a modulator of immune response and inflammation. *Adv Exp Med Biol.* 2009;647:156–73.
275. Roselli M, Mineo TC, Basili S, Martini F, Mariotti S, Aloe S, Del Monte G, Ambrogi V, Spila A, Palmirotta R, et al. Soluble CD40 ligand plasma levels in lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2004;10(2):610–4.
276. Meltzer S, Torgunrud A, Abrahamsson H, Solbakken AM, Flatmark K, Dueland S, Bakke KM, Bousquet PA, Negård A, Johansen C, et al. The circulating soluble form of the CD40 costimulatory immune checkpoint receptor and liver metastasis risk in rectal cancer. *Br J Cancer* 2021 1252. 2021;125(2):240–6.

9 ANEXOS

Anexos

ANEXO 1: Consentimiento informado.

DOCUMENTO DE INFORMACION AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO

DONANTE: _____

ACERCA DE LA DONACIÓN VOLUNTARIA DE MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA OBTENIDAS EN EL CURSO DE PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS, TERAPÉUTICOS O DIAGNÓSTICOS.

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN	Oncología Molecular
INVESTIGADOR PRINCIPAL	Dr. Carlos Camps
CENTRO	Servicio de Oncología Médica (SOM) del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia (CHGUV) y Laboratorio de Oncología Molecular de la Fundación para la Investigación del Hospital General Universitario de Valencia (FIHGUUV)
EQUIPO INVESTIGADOR	Facultativos del SOM, personal de la Unidad de Investigación Clínica del SOM, y del laboratorio de Oncología Molecular, miembros de los servicios quirúrgicos involucrados (Cirugía Torácica, Cirugía General), facultativos del servicio de Anatomía Patológica.

1. DESCRIPCIÓN GENERAL: La línea de investigación de “**Oncología Molecular**” centra sus esfuerzos en la comprensión de la patogénesis de los eventos genéticos y moleculares implicados en el origen y la progresión del cáncer. Uno de los aspectos de mayor interés en esta línea de investigación es la búsqueda de biomarcadores que puedan ser usados en la clínica y ayuden a la individualización del tratamiento del cáncer.

PROPÓSITO DE LA LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: Analizar en diferentes tipos de muestras, factores que puedan ser importantes en el diagnóstico, pronóstico y en la respuesta del cáncer a los tratamientos empleados, así como en la aparición de efectos tóxicos asociados a dichos tratamientos. Si bien la constitución genética de los seres humanos es muy similar, existen pequeñas diferencias entre las personas que, en algunos casos podrían asociarse con el desarrollo o evolución de diferentes enfermedades. Por otra parte, los tumores también presentan diferencias a nivel genético que necesitan seguir siendo estudiadas. Por lo tanto, para poder llevar a cabo esta línea de investigación, es necesario disponer de muestras biológicas para poder realizar estos estudios genéticos. También es necesario recoger datos sobre su historial médico para obtener información que pudiera tener relevancia para nuestros estudios.

2. IDENTIFICACIÓN Y DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO: Durante la intervención quirúrgica o la prueba diagnóstica a la que va a ser sometido en las instalaciones del CHGUV se tomarán muestras de sus tejidos y/o sangre. El procedimiento que se le propone consiste en donar voluntariamente una parte de la muestra biológica sobrante de la intervención o prueba a una colección de muestras que se usará con fines de investigación biomédica, sin que esto suponga ningún riesgo añadido para su salud ni comprometa el correcto diagnóstico y tratamiento de su enfermedad. También es posible que le recojamos muestras biológicas que no requieran un procedimiento invasivo, como orina heces, saliva etc. o que el procedimiento de obtención sea mínimamente invasivo como una extracción de sangre. Las muestras que done se almacenarán en una colección de muestras que corresponden a una Línea de Investigación sobre Oncología Molecular, que se encuentra en las instalaciones de la FIHGUUV y que cumple con los requerimientos establecidos en la normativa vigente.

Sus muestras solo podrán ser utilizadas en proyectos de investigación avalados científicamente y que hayan sido evaluados y aprobados por el CEIC, en los que participen miembros del equipo investigador que forma parte de esta línea de investigación.

3. OBJETIVO: El Centro Sanitario en el que usted está siendo atendido/tratado, dispone de investigadores que desean recoger y almacenar sus muestras biológicas para poder realizar proyectos de investigación biomédica en el área de la Oncología. Los resultados de dichos proyectos de investigación pueden derivar en el descubrimiento de nuevos métodos para el mejor diagnóstico, pronóstico y tratamientos.

4. BENEFICIOS ESPERADOS: Por su participación no percibirá ninguna compensación económica o de otro tipo por las muestras donadas. Sin embargo, si las intervenciones que se pudieran realizar tuvieran éxito, podrían ayudar en el futuro a pacientes que tienen la misma enfermedad o padecen otras enfermedades similares.

Las muestras de los tejidos y/o sangre no serán vendidas o distribuidas a terceros con fines comerciales.

La donación de muestras no impedirá que usted o su familia puedan hacer uso de ellas siempre que estén disponibles, cuando por razones de salud puedan ser necesarias.

5. CONSECUENCIAS PREVISIBLES DE SU REALIZACIÓN: Sólo si usted lo desea, existe la posibilidad de que pueda ser contactado en el futuro para completar o actualizar la información con la que contamos relacionada con su enfermedad.

Es posible, que los estudios realizados sobre sus muestras aporten información relevante para su salud o la de sus familiares. Tiene derecho tanto a ser informado como a que no se le informe de los datos obtenidos en la investigación. A estos efectos se entenderá que no desea recibir tal información salvo que manifieste lo contrario, utilizando para ello el formulario que y se adjunta al presente documento.

6. CONSECUENCIAS PREVISIBLES DE SU NO REALIZACIÓN Y DERECHO DE REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO. La decisión de donar muestras biológicas es totalmente voluntaria, pudiendo negarse a donarlas e incluso pudiendo revocar su consentimiento en cualquier momento, sin tener que dar ninguna explicación y sin que ello tenga ninguna repercusión en la atención médica que recibe en el Centro.

Si decidiera revocar el consentimiento que ahora presta, la parte de las muestras que no se hayan utilizado en la investigación, será destruida o anonimizada. Tales efectos, no se extenderán a los datos resultantes de las investigaciones que ya se han llevado a cabo una vez haya revocado su consentimiento.

7. RIESGOS. El procedimiento que se le propone no supone ningún riesgo añadido para su salud ni compromete el correcto diagnóstico y tratamiento de su enfermedad, puesto que se trata de muestras sobrantes de la intervención, muestras invasivas obtenidas durante los procedimientos de diagnóstico, o muestras de sangre extra que se han obtenido para ser utilizadas en investigación. En este último caso, la extracción de sangre, apenas tiene efectos secundarios, lo más frecuente es la aparición de pequeños hematomas en la zona de punción que desaparecen transcurridos 1 o 2 días. En el caso de las muestras que requieren procedimientos más complejos o invasivos, estos sólo se realizarán si forman parte del procedimiento habitual que debe realizarse para su correcto diagnóstico o tratamiento de su enfermedad.

8. PROTECCIÓN DE DATOS PERSONALES Y CONFIDENCIALIDAD. Sus datos personales y de salud serán incorporados y tratados en una base de datos de la que es responsable el Investigador del Proyecto, que debe estar inscrita en un registro nacional dependiente del Instituto de Salud Carlos III y que debe cumplir con todos los requisitos legales. Sólo el INVESTIGADOR RESPONSABLE podrá relacionar estos datos con usted, siendo responsable de custodiar el documento de consentimiento y de garantizar el cumplimiento de su voluntad en relación al uso de la muestra biológica que usted cede para investigación. La información será procesada durante el análisis de los datos obtenidos y aparecerá en los informes y/o memorias de los proyectos derivados de la Línea de Investigación, aunque en ningún caso será posible identificarle, asegurando en todo momento el cumplimiento de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal.

La cesión de muestras así como de la información contenida en las bases de datos vinculadas a las mismas, solo se realizará si forman parte de la línea de investigación en la cual participan miembros del equipo investigador, realizándose un procedimiento de codificación previo, que consiste en desligar la información que le identifica sustituyéndola por un código.

Asimismo, el titular de los datos personales podrá ejercitar los derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición al tratamiento de datos de carácter personal, incluir alguna restricción sobre el uso de sus muestras, y ejercer los derechos de revocación del consentimiento (en este último caso, conforme al formulario que figura en el apartado 11) en los términos previstos en la normativa aplicable, dirigiendo al titular del centro el escrito correspondiente firmado por Ud. y copia de un documento acreditativo de su identidad.

9. DESTINO DE LAS MUESTRAS TRAS FINALIZACION DE LA LÍNEA DE INVESTIGACION. En el supuesto de finalización de la línea de investigación, es posible que existan muestras sobrantes. En relación a las mismas, se le ofrecen las siguientes opciones: a) la destrucción de la muestra sobrante, b) su utilización en otros proyectos de investigación biomédica, para lo cual, se le ofrece la opción de donar la muestra excedente al Biobanco del CHGUV (en el siguiente apartado le explicamos de manera resumida en que consiste un biobanco y cuáles son sus objetivos). En este caso, deberá marcar esta opción en el consentimiento incluido en este documento. En dicho consentimiento usted podrá escoger si desea que esta donación se haga codificada de forma que usted pueda conocer si lo desea los resultados de las investigaciones que se lleven a cabo, o anonimizada, si usted prefiere que nunca nadie pueda recobrar la relación entre sus muestras y su persona.

10. BIOBANCO. DEFINICIÓN Y OBJETIVOS. El Biobanco del CHGUV es un establecimiento público, sin ánimo de lucro, que acoge una colección organizada de muestras biológicas. Estas muestras almacenadas en el biobanco, tienen por finalidad ser utilizadas en proyectos de investigación biomédica que hayan sido aprobados por los comités ético y científico a los que esté adscrito el biobanco. Los resultados de las investigaciones realizadas con estas muestras pueden derivar en el descubrimiento de nuevos métodos para el mejor diagnóstico de las enfermedades o en nuevas formas de tratamientos de las mismas. Sus muestras seguirán almacenadas en el biobanco hasta el fin de las existencias si no existe una revocación del presente consentimiento.

11. DECLARACIONES Y FIRMAS.

Declaración del donante:

D./Dña _____, de _____ años de edad, con domicilio en _____, DNI _____ y nº de SIP _____

D./Dña _____, de _____ años de edad, con domicilio en _____, DNI _____ en calidad de representante (en caso de minoría legal o incapacidad) del paciente _____, con DNI _____ y nº de SIP _____

DECLARO

Que he sido informado por el profesional de salud abajo firmante:

- Sobre las ventajas e inconvenientes del procedimiento
- Sobre el lugar de obtención, almacenamiento y proceso que sufrirán los datos personales y las muestras.
- Que mis muestras y datos personales serán tratados de acuerdo a la legislación vigente.
- Que en cualquier momento puedo revocar mi consentimiento y solicitar la eliminación o anonimización de todos mis datos personales y muestras que permanezcan almacenadas. Esta eliminación no se extendería a los datos resultantes de las investigaciones que ya se hubieran llevado a cabo
- Que en cualquier momento, yo, mi representante legal, o tutor, de conformidad con lo establecido en el artículo 4, punto 5 de la Ley 14/2007, de 3 de Julio, puedo solicitar información sobre los datos que se obtengan a partir del análisis de las muestras donadas.
- Que he comprendido la información recibida y he podido formular todas las preguntas que he creído oportunas

CONSIENTO

- Que el CHGUV y la FIHGUUV, a través de los miembros del equipo investigador de la Línea de Investigación: "Oncología Molecular", utilicen mis datos y las muestras, incluyendo la información sobre mi salud, para investigaciones biomédicas dentro del marco de la línea de investigación antes mencionada, manteniendo siempre la confidencialidad de mis datos.
- Libre y voluntariamente en la donación voluntaria de: (márquese con una cruz lo que proceda)
 - ☐ Mis tejidos excedentes
 - ☐ Muestra de heces, orina o saliva
 - ☐ Muestra de sangre
 - ☐ Muestras obtenidas en procedimientos que sean necesario para el diagnóstico)
- Yo, mi representante legal o tutor, accedo (márquese sí o no) a que los miembros del equipo investigador puedan contactarme en el futuro en el caso de que se estime oportuno añadir nuevos datos a los recogidos.
 - ☐ Si
 - ☐ No
- Que en el supuesto de finalización de la línea de investigación, mis muestras sean (márquese con una cruz lo que proceda)
 - ☐ destruidas
 - ☐ cedidas al Biobanco del CHGUV y anonimizadas
 - ☐ cedidas al Biobanco del CHGUV codificada, junto a los datos clínicos asociados.

D. Dña : _____ FIRMA: _____

En _____, a _____ de _____ de 20____

DECLARACIÓN DEL PROFESIONAL DE SALUD:

He informado debidamente al donante:

Nombre facultativo: _____ DNI _____ Colegiado Nº _____

FIRMA : _____

En _____, a _____ de _____ de 20____

12. REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO.

Yo, D./Dña _____, con DNI _____ revoco el consentimiento prestado en fecha _____ de _____ de 20____ y no deseo proseguir la donación voluntaria, que doy con esta fecha por finalizada.

Fdo: _____

En _____, a _____ de _____ de 20____

Yo, D./Dña _____, con DNI _____ como representante legal de D./ Dña _____, con DNI _____ revoco el consentimiento prestado en fecha _____ de _____ de 20____ y no deseo proseguir la donación voluntaria, que doy con esta fecha por finalizada.

Fdo: _____

En _____, a _____ de _____ de 20____

SOLICITUD DE INFORMACION DE DATOS O RESULTADOS DERIVADOS DE LAS INVESTIGACIONES

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN	Oncología Molecular
------------------------	---------------------

PACIENTE: _____

D./Dña _____, de ____ años de edad, con domicilio en _____, DNI _____
y nº de SIP _____

D./Dña _____, de ____ años de edad, con domicilio en _____, DNI _____
_____ en calidad de representante (en caso de minoría legal o incapacidad) del paciente
_____, con DNI _____ y nº de SIP _____

SOLICITO

Ser informado/a del resultado de las investigaciones realizadas con la/las muestra/s donada/s de manera voluntaria en fecha _____ de _____ de 20____ si éstas afectan a mi salud o a la de mi representado.

Fdo.: _____

En _____, a _____ de _____ de 20____

Anexos

ANEXO 2: Aprobación del Comité de Ética del HGUV.

APROBACIÓN PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Esta Comisión tras evaluar en su reunión de 19 de Julio de 2017 el Proyecto de Investigación:

Título:	Identificación de biomarcadores inmunes y análisis de su valor pronóstico en cáncer de mamatriple negativo		
I.P.:	Vega Iranzo Gonzalez-Cruz	Servicio/Unidad	Oncología

Acuerda respecto a esta documentación:

- Que cumple con los requisitos exigidos por esta Comisión para su realización, por tanto se decide su APROBACIÓN.

Los miembros que evaluaron esta documentación:

	Presente	Ausente	Disculpa
Presidente Dr José Vte Bagan Sebastian	x		
Dr. Carlos Camps Herrero	x		
Dra. Goitzane Marcaida Benito			x
Dr. Carlos Sánchez Juan			x
Dña. Anna Martí Monros	x		
Dr. Emilio López Alcina	x		
Dr. Rafael Paya Serrano			x
Dr. Miguel Garcia del Toro	x		
Dr. Jose Luis Sanchez Carazo	x		
Dr. Francisco Ridocci Soriano	x		
Dra. Empar Lurbe Ferrer	x		
Dª Amparo Muñoz Izquierdo			x
Dra. Amparo Esteban Rebol	x		
Dr. Enrique Zapater Latorre			x
D. Francisco Javier Gracia Perez	x		
Secretario Dra. Dolores Lopez Alarcón	x		

Lo que comunico a efectos oportunos a
miércoles, 19 de julio de 2017:

Fdo. Dr. Jose vte Bagan Sebastian
Presidente de la Comisión de Investigación:




CONSORCIO
HOSPITAL GENERAL
UNIVERSITARI
VALENCIA
DIRECCIÓN DE
INVESTIGACIÓN Y DOCENCIA

ANEXO 3. Publicaciones relacionadas con la tesis.

El trabajo se ha llevado a cabo durante más de 5 años en el Servicio de Oncología Médica del Hospital General Universitario de Valencia y la Fundación de Investigación del Hospital General Universitario de Valencia con la colaboración de los Servicios de Anatomía Patológica, Radiología y Radiodiagnóstico, Cirugía General y Oncología radioterápica, y se plasma en los siguientes artículos y comunicaciones:

- *Publicación del artículo “Update of the systemic treatment in early triple negative breast cancer”. Therapeutic Advances in Medical Oncology 13, pp. 1 - 18. 31/01/2021. ISSN 1758-8359. Categoría: Oncología. Factor de impacto: 6.9; Revista dentro del primer cuartil.*
- *Publicación del artículo “Analysis of Programmed Death-ligand 1 (PD-L1) as a predictive and prognostic biomarker in breast cancer”. Cancers 14 - 307, pp. 1 - 17. 08/01/2022. ISSN 2072-6694. Categoría: Oncología. Factor de impacto: 6.7; Revista dentro del primer cuartil.*
- *Comunicación oral de “¿Es la captación máxima de la tumoración de mama primaria en PET-TC un buen predictor de la respuesta patológica a neoadyuvancia?” en el Congreso Nacional de la Sociedad Española de Oncología Médica de 2018.*
- *Comunicación como póster destacado de “Inmunomodulación en cáncer de mama triple negativo (CMTN) precoz. Análisis de biomarcadores solubles predictivos de respuesta a quimioterapia neoadyuvante en CMTN” en el Congreso Nacional de la Sociedad Española de Oncología Médica de 2021.*
- *Comunicación como póster de “Immunomodulation in early triple negative breast cancer (TNBC). Analysis of soluble markers as predictive biomarkers to neoadjuvant chemotherapy in TNBC” en el Congreso Anual de la Sociedad Europea de Oncología Médica (ESMO Congress) de 2021.*

- *Comunicación como póster de “Study of soluble markers as predictive biomarkers to neoadjuvant chemotherapy in early triple-negative breast cancer (TNBC)” en el VII Liquid Biopsy Symposium de 2022.*
- *Comunicación como póster de “sGalectin-3, sIL-10, sMIP3a and sIL13 as Prognostic Biomarkers in Triple-Negative Breast Cancer” en el 4th Annual Congress Liquid biopsy de 2022.*
- *Comunicación como póster de “Soluble Immune-Related Factors are Associated with Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Triple-Negative Breast Cancer” en el 4th Annual Congress Liquid biopsy de 2022.*
- *Comunicación como póster de “Study of soluble markers as predictive biomarkers to neoadjuvant chemotherapy in early triple-negative breast cancer (TNBC)” en el 18th ASEICA International Congress de 2022.*
- *Comunicación como póster de “sGalectin-3, sIL-10, sMIP3a and sIL13 as Prognostic Biomarkers in Triple-negative Breast Cancer” en el 18th ASEICA International Congress de 2022.*
- *Comunicación como póster de “Study of soluble markers as predictive biomarkers to neoadjuvant chemotherapy in early triple-negative breast cancer (TNBC)” en el V Young Researchers Meeting de 2022.*
- *Comunicación como póster de “sGalectin-3, sIL-10, sMIP3a and sIL13 as Prognostic Biomarkers in Triple-negative Breast Cancer” en el V Young Researchers Meeting de 2022.*
- *Comunicación como póster de “Prognostic and predictive non-invasive biomarkers in early triple-negative breast cancer (TNBC) treated with neoadjuvant chemotherapy (NACT)” en el ESMO breast cancer Congress de 2023.*

Anexos

- *Comunicación como póster de “Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) and soluble immune checkpoints in early triple-negative breast cancer (TNBC)” en el ESMO breast cancer Congress de 2023.*
- *Comunicación como póster de “Valor pronóstico de variables clínicas e inmunohistoquímicas en cáncer de mama triple negativo (CMTN) precoz tratado con quimioterapia neoadyuvante (QTN)” en el Congreso Nacional de la Sociedad Española de Oncología Médica de 2023.*
- *Comunicación oral de “Identificación de biomarcadores no invasivos en cáncer de mama triple negativo (CMTN) precoz en pacientes tratadas con quimioterapia neoadyuvante (QTN)” en el Congreso Nacional de la Sociedad Española de Oncología Médica de 2023.*

