

TÍTULO:

ESTUDIO DEL POTENCIAL PAPEL DEL PERFIL INMUNITARIO EN
SANGRE PERIFÉRICA Y EN TEJIDO DE CARCINOMA DE MAMA CON
TRATAMIENTO NEOADYUVANTE.

LEMA:

CARACTERIZACIÓN CON LUPA.

RESUMEN (ABSTRACT)

Introducción: Parece que el sistema inmunitario de las pacientes con cáncer es diferente al de la población sana, con un perfil basal predominantemente inmunosupresor y pro-tumoral en las pacientes. En carcinoma de mama, muchos son los estudios donde se destacan mayores respuestas completas patológicas a quimioterapia neoadyuvante (QTNA) en tumores de mama con predominio linfocitario. No solo el porcentaje linfocitario infiltrante, sino los diferentes subtipos celulares del sistema inmunitario influyen en la respuesta a tratamiento y supervivencia de las pacientes con carcinoma de mama en tratamiento neoadyuvante. Así, un perfil inmunocompetente compuesto por linfocitos T CD8+ citotóxicos estaría en relación a mejores respuestas a quimioterapia neoadyuvante y mejores tasas de supervivencia, mientras que un perfil inmunosupresor compuesto por linfocitos T reguladores (Treg FOXP3+), neutrófilos asociados a tumor (TANs) y macrófagos asociados a tumor (TAMs) se asocian a peores resultados, respaldándose al sistema inmunitario como papel clave en la respuesta a la terapia oncológica.

Objetivos: Caracterización del perfil inmunitario en sangre y en tejido de las pacientes con carcinoma de mama candidatas a tratamiento neoadyuvante antes y después de la QTNA y comparativa con un grupo de personas sanas. Además, determinar su valor predictivo de respuesta a la QTNA y su valor pronóstico.

Material y métodos: Estudio traslacional prospectivo, reclutándose, de enero de 2011 a mayo de 2013, un total de 47 pacientes con diagnóstico de carcinoma de mama en el Área Hospitalaria Virgen Macarena y consideradas subsidiarias de tratamiento neoadyuvante. Un total de 20 personas sanas formaron el grupo de población sana. Las pacientes recibieron tratamiento neoadyuvante según guías de práctica clínica habitual.

Se realizaron análisis de sangre periférica, biopsia de tejido tumoral al diagnóstico y estudio de la pieza quirúrgica post-tratamiento para la caracterización de las poblaciones celulares del perfil inmunitario en tejido mediante técnicas inmunohistoquímicas (linfocitos T CD8+ y Treg FOXP3+) y en sangre periférica mediante citometría de flujo (leucocitos, neutrófilos, linfocitos, monocitos, linfocitos T, linfocitos B, linfocitos NK, linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+, linfocitos Treg y ratios neutrófilos/linfocitos, linfocitos/monocitos, CD4/CD8, CD8/Treg), antes y después del tratamiento neoadyuvante.

Además, se recogieron las respuestas patológicas alcanzadas (sistema de gradación de Miller & Payne).

Resultados: En las pacientes con carcinoma de mama hay mayores niveles basales en sangre de leucocitos ($p = 0.004$), neutrófilos ($p < 0.001$), ratio neutrófilos/linfocitos ($p < 0.001$) y Treg pro-tumoral ($p = 0.028$) y menores niveles de células con acción anti-tumoral como linfocitos T ($p < 0.001$), linfocitos B ($p = 0.009$), T CD4+ ($p < 0.001$), T CD8+ ($p = 0.001$), ratio linfocitos/monocitos ($p = 0.018$) y CD8/Treg ($p < 0.001$), respecto a sanas.

En las pacientes que no alcanzan RCp tras tratamiento neoadyuvante, se produce una disminución de T CD8+ en tejido y en sangre ($p \leq 0.044$); además, hay disminución de Treg en sangre en RCp ($p \leq 0.044$).

En las pacientes que alcanzan mayor SLE y SG tras tratamiento neoadyuvante, hay descenso de Treg en sangre periférica ($p < 0.05$) y un aumento del ratio CD4/CD8 en sangre periférica ($p = 0.028$).

Conclusiones: El perfil inmunitario de las pacientes con diagnóstico de carcinoma de mama es predominantemente inmunosupresor y diferente al de sanas. El descenso de las poblaciones celulares pro-tumorales y el aumento de las anti-tumorales tras tratamiento neoadyuvante tanto en tejido como en sangre periférica se correlaciona con una mayor RCp y mejor SLE y SG.

Son necesarios más estudios con mayor poder estadístico para establecer definitivamente a las poblaciones celulares del sistema inmunitario como potenciales biomarcadores predictivos y pronósticos.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, el cáncer de mama es el tumor maligno diagnosticado con mayor frecuencia y la principal causa de muerte por cáncer en las mujeres.

El abordaje multidisciplinar (anatomía patológica, radiodiagnóstico, cirugía, radioterapia, oncología médica, etc.) en el manejo diagnóstico-terapéutico de los tumores implica una reducción en la morbi-mortalidad por cáncer¹. En los últimos años, existe un consenso general en que la mayoría de las pacientes con carcinoma de mama localmente avanzado y algunas en estadio precoz (particularmente si son fenotipo triple negativo ó HER2 positivo) deberían ser consideradas para terapia sistémica neoadyuvante previa a la cirugía.

Los objetivos del tratamiento neoadyuvante son, entre otras, reducir el tamaño tumoral mejorando las opciones quirúrgicas y obtener información sobre la sensibilidad al tratamiento y la respuesta tumoral. Se pretende, así, incrementar las tasas de cirugía conservadora en aquellas pacientes con carcinoma de mama operable y convertir en operables aquellos tumores inoperables de entrada por tamaño o extensa afectación locoregional.

El uso del tratamiento sistémico neoadyuvante puede proporcionar información pronóstica muy relevante^{2,3}. La obtención de una RCp tras la terapia neoadyuvante se asocia favorablemente a mejores resultados en SLE y SG en el carcinoma de mama en estadio temprano^{4,5}. Así, la RCp es un destacado marcador subrogado con valor pronóstico mayor en aquellos subtipos tumorales de mayor agresividad tumoral (triple negativo ó HER2+)^{6,7}. Sin embargo, y aunque los tumores RH+ tienen mejores tasas de supervivencia debido en parte a la naturaleza intrínseca del subtipo y al uso de terapia hormonal en adyuvancia, aquellos que logran RCp también tienen mejores tasas de SG respecto a los tumores RH+ sin RCp (aunque sólo un bajo porcentaje de los pacientes con RH positivo logran RCp tras QTNA)^{5,8}.

Múltiples autores han intentado definir el concepto de respuesta tumoral al tratamiento por su relación con el pronóstico. Estas clasificaciones tienen en cuenta el tamaño tumoral, la presencia de carcinoma in situ, la cantidad de celularidad residual, la apariencia histológica, el grado, y la respuesta ganglionar, entre otras variables, relacionadas con el efecto de la quimioterapia. Sin embargo, no existe acuerdo sobre la mejor definición de la respuesta patológica completa⁹⁻¹¹.

Actualmente las clasificaciones más empleadas son el sistema de Miller & Payne¹⁰, el sistema TNM de la AJCC⁹ y la carga tumoral residual (RCB, residual cancer burden)¹¹.

Actualmente se considera que los tumores se componen, además de por las células neoplásicas, por un gran repertorio de otras poblaciones celulares reclutadas formando un “microambiente tumoral” específico, con múltiples interacciones entre todos sus elementos integrantes¹².

De este modo, los nuevos modelos en el desarrollo del cáncer incorporan el concepto de **Inmunoedición** como un elemento principal en el proceso de carcinogénesis.

Hay tres fases esenciales en este proceso: eliminación, equilibrio y escape. Inicialmente, el sistema inmunitario innato y adaptativo intentan controlar el crecimiento tumoral tras el reconocimiento de PAMPs, DAMPs, secreción de citoquinas proinflamatorias (IL-12 e IFN- γ), aumento de neutrófilos, y acción de las células NK, células dendríticas y macrófagos. Posteriormente, las células dendríticas migran a los ganglios linfáticos cercanos donde presentan los antígenos tumorales y activan a los linfocitos T CD4 + y CD8 + específicos de tumor que emigran al sitio del tumor y realizan su acción citotóxica antitumoral. En esta fase de equilibrio, si el tumor desarrolla mecanismos de escape tumoral eficaces, se producirá la fase de escape, conduciendo a la manifestación clínica tumoral¹³.

Por parte del tumor, en un primer lugar se produce un crecimiento lento, casi homogéneo, de las colonias de células tumorales intentando evadir su detección por el sistema inmunitario innato. Un ejemplo sería el carcinoma ductal in situ de mama (primera etapa-colonización). Posteriormente, esa colonia tumoral va reclutando linfocitos, monocitos y macrófagos y otras células del estroma con liberación de citoquinas proinflamatorias, factores de crecimiento y quimiocinas (TNF- α , TGF- β , IL-10, IL-4). Durante el proceso, los macrófagos y fibroblastos cercanos se convierten en macrófagos asociados a tumor (TAMs, tumor-associated macrophages), en fibroblastos asociados a cáncer (CAFs, cancer-associated fibroblasts) y en células supresoras derivadas mieloides (MDSCs, myeloid-

derived suppressor cell) (segunda etapa-infiltración de linfocitos-eliminación). A continuación, se produce una tercera etapa donde los CAFs encapsulan al tumor con matriz extracelular produciéndose progresión del crecimiento tumoral, de manera “silenciosa”, intentando no liberar señales pro-inflamatorias y con inhibición de los linfocitos (tercera etapa-equilibrio). Finalmente, algunas células tumorales dentro de la masa tumoral pueden emprender el proceso de transición epitelio-mesénquima conduciendo al desarrollo de metástasis (cuarta etapa-transición epitelio-mesénquima-escape inmunitario). Si la metástasis al llegar a un nuevo tejido, evade nuevamente a la respuesta inmunitaria, se establece el estadio metastásico^{14,15}.

Una infiltración linfocitaria elevada en el TME, parece correlacionarse con una mayor respuesta a la QTNA^{16,17} y a un mejor pronóstico¹⁸⁻²⁴ en determinados subtipos de carcinoma de mama. Al estudiar los TILs como biomarcador pronóstico y predictivo en triple negativo y en HER2+, varios son los estudios realizados en neoadyuvancia en carcinoma de mama que demuestran que no solo el porcentaje de TILs, sino que también el tipo de subpoblaciones celulares presentes en el microambiente tumoral, determinará el balance entre un sistema inmunitario pro-tumoral o anti-tumoral con impacto en la respuesta a tratamiento y en la supervivencia¹⁸⁻²². Ladoire et al.¹⁹ muestra como la RCp alcanzada tras QTNA se asoció a la desaparición de los Treg FOXP3+ y Liu et al.²² muestra como la mayor infiltración de LT CD8+ citotóxicos y la menor densidad de Treg FOXP3+ se relaciona favorablemente con la supervivencia.

Dada la importancia de establecer de manera consistente el infiltrado inmunitario en el TME de las muestras tumorales, Salgado et al.²⁵ publicaron un documento de consenso con metodología para ofrecer uniformidad y mejorar la consistencia y reproducibilidad en la medición de TILs por técnicas inmunohistoquímicas. Aunque no hay una recomendación estándar establecida con respecto a un umbral de TILs específico para considerar a un tumor con predominio linfocitario (LPBC, Lymphocyte-predominant breast cancer), el término LPBC hace referencia a tumores que contienen más linfocitos que células tumorales, pudiendo variar los límites entre $\geq 50-60\%$.

Se ha observado como el tratamiento oncológico, ya sea quimioterapia, radioterapia o inmunoterapia podría alterar el estado inflamatorio inmunitario de los tumores. Concretamente, la QTNA con antraciclinas, sales de platino y taxanos podría inducir muerte celular o apoptosis inmunogénica aumentando los TILs T CD8+, especialmente en CMTN y HER2+. Se produciría así, una liberación de antígenos, reconocidos por las células dendríticas con la posterior activación de Th CD4+ y T CD8+ con acción citotóxica¹⁶⁻¹⁹. Trastuzumab, a través de la porción humanizada Fc de la IgG1 es capaz de actuar como un anticuerpo autólogo y activar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) por las células NK. De hecho, autores como Tamura et al.²³. y Gennari et al.²⁴ muestran un aumento de células T CD8+ y T CD4+ tras QTNA con trastuzumab, apoyando la idea de que este anticuerpo monoclonal humanizado podría activar los mecanismos para reclutar linfocitos en el TME.

Así, la modificación de los TILs por el tratamiento oncológico, podría convertir un tumor frío poco inmunogénico como puede ser el carcinoma de mama en un tumor más inmunogénico, influyendo en la respuesta a tratamiento y en el pronóstico^{16-19,23,24}.

Denkert et al.¹⁶ en el año 2010 estudió el infiltrado linfocitario en un total de 1058 biopsias de pacientes con carcinoma de mama previo a QTNA con antraciclinas y taxanos procedentes de los estudios GeparDuo y GeparTrio, concluyendo que el porcentaje de TILs era un predictor independiente de RCp en ambas cohortes (p 0.012; p 0.001). Así, el carcinoma con predominio linfocitario (LPBC) alcanzó tasas de RCp del 40% en GeparTrio y del 42% en GeparDuo, mientras que aquellos tumores sin infiltración linfocitaria (no-LPBC), tuvieron una tasa de RCp del 7% y 3%, respectivamente.

Un nuevo trabajo del equipo de Denkert et al. en el año 2015²⁶ estudió la densidad de TILs en un total de 580 biopsias tumorales pre-QTNA procedentes del estudio GeparSixto. Se investigaba el efecto sobre la RCp de añadir carboplatino neoadyuvante al esquema con antraciclinas y taxanos en carcinoma de mama HER2+ y triple negativo. El incremento de TILs en el estroma fue factor independiente de RCp tanto en el análisis univariante (p < 0.001) como en el multivariante (p < 0.001). Así, la tasa de respuesta completa patológica fue del 59.9% en LPBC y del 33.8% en no-LPBC.

Issa-Nummer et al.²⁷ estudió de manera prospectiva el valor predictivo de respuesta a QTNA con antraciclinas y taxanos del infiltrado inmunitario en 313 biopsias pre-QTNA de pacientes con

carcinoma de mama HER2- procedentes del estudio GeparQuinto. Los TILs intratumorales (iTuLy), TILs estromales (strLy) y LPBC fueron estudiados y comparados con la RCp. Aquellos pacientes con LPBC tuvieron una tasa de RCp mayor (36.6%) comparada con no-LPBC (14.3%), $p < 0.001$.

Ladoire et al.¹⁸ evaluó la infiltración por TILs CD3+ y sus subtipos TCD8+ y T FOXP3+ en 56 pacientes con carcinoma de mama antes y después de la QTNA. La evaluación pre-QTNA mostró que una mayor infiltración por T CD3+, CD8+ y FOXP3+ se asoció a factores pronósticos negativos como RH-, mayor grado tumoral y afectación ganglionar. La evaluación post-QTNA mostró que la quimioterapia producía un descenso del infiltrado FOXP3+, pero no modificación de T CD3+ ni de T CD8+, a favor de la inducción de una respuesta anti-tumoral por parte de la quimioterapia. Y, en concreto, cuando se alcanzaba RCp, se producía un descenso aún mayor de FOXP3+, mientras que en no RCp se mantenía elevado. Así, la alta infiltración por linfocitos T CD8+ y la no infiltración por FOXP3+ en el tejido post-QTNA, se asoció con la RCp en una alta sensibilidad (75%) y especificidad (93%).

Mahmoud et al.^{28,29} también estudió el infiltrado T CD8+²⁸ y de FOXP3+²⁹ en piezas quirúrgicas de carcinoma de mama, sin neoadyuvancia. Se observó que la infiltración T CD8+ se correlacionaba inversamente con la edad al diagnóstico y con la positividad de los RH y positivamente con la supervivencia. FOXP3+ se correlacionó con peor pronóstico, mayor grado tumoral y RH- en el análisis univariante. Sin embargo, en el análisis multivariante, FOXP3+ no resultó ser factor pronóstico independiente, sugiriendo que otras células del TME pudieran tener un papel pronóstico más crítico.

Así, el fenómeno de la immunoedición se ha postulado como un evento crucial, junto a los modelos previos de alteraciones en genes y al fenómeno de la carcinogénesis, en el inicio y progresión del cáncer. Esta condición de modulación del sistema inmunitario por parte de los tumores puede ser estudiada tanto en sangre periférica como en tejido. La posibilidad de acometer análisis de perfiles inmunitarios en sangre periférica proporciona una serie de ventajas sobre el estudio histopatológico de las biopsias seriadas como son la comodidad en la obtención de la muestra y posibilidad de monitorización en tiempo real de la evolución de los marcadores inmunitarios. En este sentido, en los últimos años ha emergido el concepto de “**biopsia líquida**” en cáncer en general (también en cáncer de mama), aprovechando las posibilidades que brinda el estudio de células tumorales, los fragmentos de ADN tumoral circulantes en sangre periférica, y por qué no, también las poblaciones celulares inmunológicas³⁰.

Basándonos en las referencias descritas, nuestro objetivo en este trabajo es la caracterización del perfil inmunitario en sangre y en tejido de las pacientes con carcinoma de mama candidatas a tratamiento neoadyuvante antes y después de la QTNA y comparativa con un grupo de personas sanas. Además, determinar su valor predictivo de respuesta a la QTNA y su valor pronóstico.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Hipótesis:

El perfil inmunitario en sangre periférica en pacientes con diagnóstico de carcinoma de mama candidatas a QTNA es diferente a la población sana, con predominio de un ambiente inmunosupresor. La respuesta inmunitaria medida en sangre periférica y en tejido, y sus modificaciones con la QTNA en carcinoma de mama, caracterizada por el estudio de las poblaciones celulares presentes antes y después del tratamiento, tiene valor predictivo para respuesta completa patológica (RCp) y valor pronóstico en relación a supervivencia.

Objetivos primarios:

1.-Evaluación de las poblaciones celulares pre-QTNA y sus modificaciones tras QTNA en tejido (linfocitos T CD8+ y Treg FOXP3+) y en sangre periférica (leucocitos, neutrófilos, linfocitos, monocitos, linfocitos T, linfocitos B, linfocitos NK, linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+, linfocitos

Treg y ratios neutrófilos/linfocitos, linfocitos/monocitos, CD4/CD8, CD8/Treg) y comparación con el grupo de sanas.

2.-Determinación del valor predictivo de respuesta a la QTNA (respuesta patológica alcanzada medida por el sistema de gradación de Miller & Payne) y el valor pronóstico (supervivencia global, supervivencia libre de enfermedad) de las poblaciones celulares del sistema inmunitario en tejido y en sangre periférica, tanto pre-QTNA como post-QTNA.

Objetivo secundario:

1.-Determinación de la respuesta patológica (medida por el sistema de gradación de Miller & Payne) en mama, ganglionar y global (mama y ganglionar).

DISEÑO DEL ESTUDIO

Tipo de estudio

Estudio traslacional prospectivo, basado en la caracterización del perfil inmunitario en tejido y en sangre periférica, antes y después de la quimioterapia neoadyuvante (QTNA) y su correlación con las respuestas patológicas alcanzadas, supervivencia y características clínico-histológicas del tumor (inmunofenotipo tumoral y estadio TNM) en una cohorte de pacientes diagnosticadas de carcinoma de mama candidatas a QTNA según guías de práctica clínica habitual en el Hospital Universitario Virgen Macarena, y comparativa con una cohorte de personas sanas.

Al ser un estudio traslacional, incluye una investigación básica de laboratorio/anatomía patológica y una investigación clínica, de manera que se facilite la transición y aplicabilidad de los hallazgos de la investigación básica en la práctica clínica y, en consecuencia, lograr un potencial impacto clínico mayor en el área de la salud.

Población de estudio

Reclutamiento de pacientes con diagnóstico anatomopatológico de carcinoma de mama en el Área Hospitalaria Virgen Macarena durante enero 2011-mayo 2013 y consideradas subsidiarias de QTNA en el seno de la Subcomisión de Cáncer de Mama, bien con intención de cirugía conservadora o por tratarse de carcinoma de mama localmente avanzado.

Los criterios de inclusión/exclusión fueron los siguientes:

Criterios de inclusión

- Carcinoma primario unilateral de mama, confirmado histológicamente con biopsia incisional.
- Tumor medible bi-dimENSIONalmente por mamografía, ecografía o RM.
- No evidencia de metástasis a distancia.
- Edad de 18 a 70 años.
- Aceptación por escrito del consentimiento informado y de análisis de poblaciones celulares en sangre periférica y en tejido tumoral.

Criterios de exclusión

- Cáncer de mama bilateral y/o metastásico.
- Cáncer de mama previamente tratado (cirugía, radioterapia, tratamiento endocrino o citotóxico).

Además, se incluyó un grupo de personas sanas, con características similares a las pacientes (edad, sexo femenino), pero sin diagnóstico conocido de cáncer.

Seguimiento

Se realizó un seguimiento total durante 9 años (108 meses) para el análisis de supervivencia global (desde la fecha de diagnóstico hasta la fecha de muerte) y libre de enfermedad (desde la fecha de diagnóstico hasta la fecha de recaída), contando desde la fecha de diagnóstico de la primera paciente incluida en enero 2011 hasta enero 2020.

Variables

-Tipo de respuesta a QTNA medido mediante Miller & Payne:

Se considera **respuesta completa patológica** en mama si gradación “G5”; ganglionar axilar si gradación “D”; en mama y axila si gradación “G5D”:

- Valoración respuesta en mama:
 - G1= Mínimos cambios celulares individuales, sin reducción en su número global.
 - G2= Reducción < 30% del número de células tumorales (celularidad global aún muy elevada).
 - G3= Moderada reducción entre 30-90% del número de células tumorales.
 - G4= Casi RCp= Casi respuesta completa patológica= presencia residual de focos microscópicos con reducción superior al 90% (pequeños clusters de células dispersas).
 - G5= RCp= Ausencia completa de células tumorales identificables en la localización previa del tumor.
- Valoración respuesta ganglionar axilar:
 - A= Ganglios linfáticos negativos, sin cambios atribuibles a la quimioterapia.
 - B= Ganglios linfáticos positivos, sin cambios atribuibles a la quimioterapia.
 - C= Ganglios linfáticos positivos, pero con evidencia de respuesta parcial.
 - D= Ganglios linfáticos negativos, con cambios atribuibles a la quimioterapia.

Si no se produce respuesta completa patológica, se considera “**respuesta parcial**” si se objetiva cambio, pero no completa desaparición tumoral; y “**no respuesta**” si no hay cambios o incluso progresión tras quimioterapia neoadyuvante.

-Poblaciones celulares.

En muestra **histológica** (evaluadas con la Clasificación de Ladoire o Black modificado):

- Linfocitos T citotóxicos (T CD8+)
- Linfocitos T reg (FOXP3+)

En **sangre periférica** (células/microlitro):

- Leucocitos
- Neutrófilos
- Linfocitos
- Monocitos
- Linfocitos T (CD3+)
- Linfocitos B (CD19+)
- Linfocitos NK (CD3-CD16+56+)
- Linfocitos T CD4+ helper (CD3+CD4+)
- Linfocitos T CD8+ citotóxicos (CD3+CD8+)
- Linfocitos Treg (CD4+CD25+CD127-)
- Ratio neutrófilos/linfocitos
- Ratio linfocitos/monocitos
- Ratio CD4/CD8
- Ratio CD8/Treg

Se ha realizado las siguientes caracterizaciones:

	PACIENTES	SANAS
Basal/Pre-QTNA	Perfil inmunitario tejido Perfil inmunitario sangre	Perfil inmunitario sangre
C3/Durante-QTNA	Perfil inmunitario sangre	
C6/Post-QTNA	Perfil inmunitario tejido Perfil inmunitario sangre	

Estudio histológico

Para el estudio de las poblaciones celulares del sistema inmunitario en el microambiente tumoral en tejido se ha empleado el siguiente protocolo.

- **Muestra histológica pre-neoadyuvancia**

Antes de iniciar el tratamiento se obtuvieron de cada paciente 6 biopsias trucotecodirigidas de diferentes zonas representativas del core tumoral (3) y su periferia (3), para diagnóstico histopatológico de certeza y análisis inmunohistoquímico.

- **Muestra histológica post-neoadyuvancia**

La pieza tumoral procedente de la cirugía (mastectomía o cirugía conservadora, extracción ganglio centinela o linfadenectomía parcial/radical) tras QTNA se estudió exhaustivamente con un amplio muestreo de los márgenes para posterior análisis inmunohistoquímico.

Estudio de TILs. Sistema de Gradación de Black modificado (clasificación de Ladoire, Black grading system).

Se realizó un estudio de los TILs con hematoxilina-eosina para obtener un sistema de clasificación semicuantitativo denominado sistema de Black modificado (clasificación de Ladoire, Black grading system): grado 0 (ausencia de infiltrado linfocitario), grado 1 (mínima presencia de linfocitos, algunos linfocitos aislados), grado 2 (presencia moderada de linfocitos), grado 3 (presencia moderada-alta de linfocitos) y grado 4 (intensa infiltración por linfocitos, asemeja órgano linfoide).

Los grados 2 y 3 se concentraron en un solo grupo, quedando por tanto 3 categorías (0, 1, 2 y 3). El análisis ulterior de TILs se llevó a cabo examinando 20 CGA de 10 áreas independientes con mayor densidad de TILs (5 de área epitelial tumoral y 5 de área estromal). En el caso de remisión completa patológica, se analizó exhaustivamente el estroma donde inicialmente asentaba el tumor, valorando 10 áreas y calculando la media de TILs del estroma post-remisión completa. El estudio semicuantitativo se aplicó también sobre las diferentes subpoblaciones linfocitarias (linfocitos T citotóxicos CD8+ y T reguladores FOXP3+).

De este modo, se estableció el grado de infiltración linfocitaria empleándose el sistema de Black modificado (clasificación de Ladoire, Black grading system):

Grado 0: ausencia de células de una población linfocitaria específica.

Grado 1: 1-5 células en 5f/20x.

Grado 2: 5-15 células en 5f/20x.

Grado 3: > 15 células en 5f/20x.

Anticuerpos específicos para TIL (CD3+) y subtipos (T CD8+ y Treg FOXP3+)

El estudio inmunohistoquímico se realizó sobre tejido parafinado con anticuerpos dirigidos específicamente contra T CD3+ (#IS503), T CD8+ (#IS623) y Tregs (FOXP3+), de la casa DAKO y e-Bioscience.

Estudio en sangre periférica

Por cada paciente incluido en el estudio se realizaron tres extracciones de sangre periférica (antes, durante y tras el tratamiento) correspondientes a las extracciones basal, ciclo 3 y C6; para el grupo control se realizó un único análisis (basal).

De la muestra de sangre basal, durante el tratamiento y tras QTNA se obtuvo un con EDTA con la muestra de sangre periférica que posteriormente se analizó.

Por cada muestra de sangre periférica se realizó un hemograma y un marcaje celular con anticuerpos monoclonales para su análisis por citometría de flujo; se empleó el citómetro de flujo FACSCanto™ II. Con el porcentaje de las poblaciones celulares dadas por el citómetro y a partir del número absoluto de leucocitos, neutrófilos, linfocitos totales y monocitos dados por el hemograma, se calcularon los números absolutos de las diferentes poblaciones celulares; los resultados obtenidos se recogieron con el *software* BD FACSDiva™.

● **Hemograma.**

Se realizó un hemograma en el laboratorio de Urgencias (Equipo Sysmex CS-1000) con el que se obtuvo un recuento absoluto de leucocitos totales, neutrófilos, linfocitos totales y monocitos.

● **Estudio de linfocitos T reguladores.**

Para el marcaje de los linfocitos T reguladores se empleó el siguiente anticuerpo monoclonal:

- Human Regulatory T Cell Cocktail (Ref: 560249; BD Pharmingen™). Contiene:
 - FITC Anti-Human CD4;
 - PE-Cy™7 anti-Human CD25;
 - Alexa Fluor® 647 anti-Human CD127.

● **Estudio de otras subpoblaciones linfocitarias.**

Se analizaron subpoblaciones de linfocitos T, B y NK empleando el siguiente anticuerpo monoclonal:

- BD Multitest™ 6-Color TBNK (Ref: 337166; BD Multitest™). Contiene:
 - FITC / CD3;
 - PE / CD16 + PE / CD56;
 - PerCP-Cy™5.5 / CD45;
 - PE-Cy™7 / CD4;
 - APC / CD19;
 - APC-Cy™7 / CD8.

Análisis estadístico

Cálculo del tamaño muestral

Para el cálculo del tamaño mínimo de muestra se consideraron los datos de remisión completa tras tratamiento y, en consecuencia, de supervivencia referenciados en la bibliografía, teniendo en cuenta los esquemas de tratamiento empleados en la población de estudio, se publicaban cifras de remisión completa anatomopatológica del 65% en pacientes HER2+ y del 30% en pacientes HER2-. Puesto que aproximadamente un 30% de las pacientes son HER2+, la cifra de remisión completa patológica global esperable estaría en torno al 41%, que asumiendo un error alfa de 0,05 y una precisión de 0,2 nos da un tamaño de muestra mínimo de 24 pacientes.

Sin embargo, si queremos realizar este cálculo independientemente para cada estrato, puesto que deseamos analizar la remisión completa anatomopatológica en el conjunto de las pacientes, pero también separadamente en aquellas cuyos tejidos tumorales sobreexpresan o no la proteína HER2, para un 65% y un 30% de remisión completa anatomopatológica, asumiendo un error alfa de 0,05 y una precisión de 0,2, el tamaño mínimo muestral necesario era de 43 pacientes.

Para la selección del tamaño muestral de la población sana, tras elegir a 20 sujetos sanos iniciales y comprobar la no variabilidad de la muestra en las variables analizadas, se consideró un tamaño muestral de sanas de 20 como representativo.

Finalmente, se reclutaron un total de 47 pacientes para la cohorte de pacientes y un total de 20 personas en la cohorte de sanas.

El análisis estadístico fue realizado con el programa SPSS 25.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Inicialmente se realizó un análisis descriptivo de las variables clínicas, epidemiológicas y de las poblaciones celulares (variables categóricas y numéricas).

Se empleó el test de ShapiroWilk para contrastar normalidad, mostrándose ausencia de distribución normal en nuestra muestra. Para la expresión cuantitativa de las poblaciones celulares en sangre se empleó la mediana e intervalo de confianza del 95% (IC 95%), mientras que para la expresión de las poblaciones linfocitarias en tejido se empleó el porcentaje e IC 95%. En el estudio de las variaciones de las poblaciones linfocitarias y ratios de los mismos empleamos como punto de corte la mediana calculada.

Para el contraste estadístico entre grupos planteamos como hipótesis nula que NO habría diferencias en los niveles celulares entre los pacientes con RCp y los pacientes con no RCp, así como entre los niveles celulares entre cohorte sana y cohorte de pacientes ($p > 0.05$), mientras que la hipótesis alternativa sería que SÍ habría diferencias ($p < 0.05$).

Las poblaciones celulares fueron comparadas antes y después del tratamiento neoadyuvante empleándose el test para muestras apareadas de Wilcoxon, mientras que para comparar los niveles de poblaciones celulares según RCp/no RCp ó según cohorte de pacientes/sanas se empleó el test de U Mann-Whitney.

En el análisis de supervivencia global, supervivencia libre de enfermedad y supervivencia libre de enfermedad a distancia, se realizaron curvas de Kaplan-Meier.

Se asumió un error alfa de 0,05 y por lo tanto $p \leq 0.05$ fue considerado para indicar diferencias estadísticamente significativas.

La heterogeneidad del carcinoma de mama, el tamaño muestral limitado y los pocos eventos para el análisis de supervivencia pueden suponer limitaciones en las correlaciones que se establezcan y que no arrojen resultados estadísticamente significativos si las diferencias no son excesivamente grandes.

Aspectos éticos

Este estudio se ha llevado a cabo en cumplimiento con el protocolo, de acuerdo con la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal, la Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica, la última versión de la Declaración de Helsinki, el Convenio de Oviedo sobre los derechos humanos y biomedicina, así como resto de normas y/o legislación que le fuesen de aplicación.

Este trabajo fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación del Hospital Virgen Macarena (Código LCM-INM-2015-01).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características clínico-epidemiológicas.

De enero de 2011 a mayo de 2013 se reclutaron un total de 47 pacientes. Un total de 20 personas sanas con características similares a las de las pacientes y sin diagnóstico conocido de patología tumoral, formaron el grupo de población sana. Las características clínico-epidemiológicas se muestran en la **tabla 1**.

Respuesta a quimioterapia neoadyuvante.

Al medir las respuestas según el sistema de evaluación de Miller & Payne, 11 (21%) pacientes alcanzaron RCp en mama (G5), 15 (32%) a nivel ganglionar (D) y 7 (15%) pacientes alcanzaron RCp en mama y ganglionar (G5D). **Figura 1**.

Perfil inmunitario en SANGRE PERIFÉRICA.

1. Pacientes vs sanas (tabla 2 y figura 2).

a. Hay mayores niveles basales estadísticamente significativos de leucocitos ($p = 0.004$), neutrófilos ($p < 0.001$), Treg ($p = 0.028$) y ratio neutrófilos/linfocitos ($p < 0.001$) en pacientes respecto a sanas. Debido al estado inflamatorio específico de las pacientes, se detecta una leucocitosis³¹ y una neutrofilia^{32,13}, siendo estas últimas de las primeras células del sistema inmunitario en luchar contra un daño producido en el organismo, con la activación del sistema inmunitario ante el proceso de carcinogénesis y la perpetuación del mismo. Se produce una reacción “leukemoide” de origen paraneoplásico como resultado de la liberación por parte del tumor de factores de crecimiento de la línea mieloide (G-CSF, GM-CSF, IL-6)³², donde prima la neutrofilia y la monocitosis. Ese estado de leucocitosis favorecería el desarrollo tumoral³³ y la trombosis asociada a cáncer por la generación de NETs por parte de los neutrófilos³⁴, liberación de factores procoagulantes, etc.

Los Treg se encuentran incrementados acorde a los resultados de los autores Li CH et al.³⁵, Wang ZK et al.³⁶, Liu JT et al.³⁷ y Liyanage UK et al.³⁸, debido a la inmunodepresión producida en el ambiente tumoral que se perpetúa con la acción inhibitoria de los Treg sobre los T CD8+ citotóxicos.

Dado el aumento de neutrófilos y la disminución de linfocitos, se produce un mayor ratio neutrófilos/linfocitos en pacientes respecto a sanas³⁹⁻⁴¹.

b. En pacientes hay menores niveles basales estadísticamente significativos de linfocitos totales ($p < 0.001$), linfocitos T ($p < 0.001$), linfocitos B ($p = 0.009$), T CD4+ ($p < 0.001$), T CD8+ ($p = 0.001$), ratio linfocitos/monocitos ($p = 0.018$), ratio CD4/CD8 ($p = 0.003$) y ratio CD8/Treg ($p < 0.001$), respecto a sanas.

Los niveles disminuidos de linfocitos reflejan la inmunosupresión en el ambiente tumoral de las pacientes como mecanismo de escape para favorecer la progresión. Aunque en estadios precoces de la carcinogénesis pueden estar aumentados los linfocitos T CD4+ y T CD8+⁴², posteriormente se produce la linfo-supresión de linfocitos T citotóxicos efectores y un aumento de aquellos con acción inmunosupresora pro-tumoral como los Tregs⁴³⁻⁴⁶.

Las ratios linfocitos/monocitos, CD4/CD8 y CD8/Treg acordes a nuestra hipótesis y a la de trabajos previos^{42, 47-49} se encuentran disminuidos dada la inmunosupresión linfocitaria con aumento de Treg.

2. Correlación con la RCp (Sistema M&P) (Tabla 3 y figura 3).

a. Los niveles pre-QTNA de leucocitos ($p \leq 0.011$) y neutrófilos ($p \leq 0.011$) son mayores en no RCp vs RCp, con diferencias estadísticamente significativas.

b. Los niveles post-QTNA de neutrófilos ($p \leq 0.019$), monocitos ($p = 0.019$) y Treg ($p \leq 0.003$) son estadísticamente mayores en no RCp vs RCp, mientras que el ratio linfocitos/monocitos ($p \leq 0.006$) es menor en no RCp vs RCp.

Estos hallazgos podrían estar en relación al papel pronóstico negativo de estas poblaciones celulares del sistema inmunitario, por lo que niveles elevados de las mismas disminuirían la respuesta a la quimioterapia neoadyuvante, lo que dificultaría lograr una RCp. La reacción “leucemoide” paraneoplásica, donde prima la neutrofilia y la monocitosis, favorecería el desarrollo tumoral³³. Los neutrófilos probablemente serían de tipo TANs^{34,50,51} y los monocitos serían de tipo M2 (TAMs)⁴³⁻⁴⁵ con acción pro-tumoral, confiriendo por tanto resistencia al tratamiento oncológico. La presencia de Treg se relacionaría con una linfo-supresión sobre los T CD8+, lo que conferiría también resistencia al tratamiento⁴⁷⁻⁴⁹. Como consecuencia de todo lo anterior, con una linfo-deplección y un aumento de los niveles de monocitos, encontramos un ratio linfocito/monocito disminuido^{39,40,52} en no RCp.

c. Con el tratamiento neoadyuvante se observan las siguientes modificaciones:

En RCp se produce un descenso estadísticamente significativo de los niveles de monocitos ($p = 0.043$) y Tregs ($p \leq 0.044$), mientras que hay un ligero aumento de los linfocitos T CD8+ y T CD4+ (no estadísticamente significativo) y un aumento del ratio CD8/Treg (no estadísticamente significativo). En no RCp se produce un descenso estadísticamente significativo de los niveles de neutrófilos ($p = 0.048$), leucocitos ($p = 0.003$), linfocitos totales ($p \leq 0.001$), linfocitos B ($p < 0.001$), linfocitos NK ($p = 0.001$), linfocitos T ($p \leq 0.005$), T CD8+ ($p \leq 0.004$), T CD4+ ($p \leq 0.041$), ratios linfocitos/monocitos ($p \leq 0.006$) y CD4/CD8 ($p \leq 0.039$; en respuesta global), mientras que no hay modificación de los Treg.

Los hallazgos de nuestro trabajo apoyan la idea del papel inmunomodulador del tratamiento oncológico con la liberación de antígenos, reconocidos por las células dendríticas con la posterior activación de Th CD4+ y T CD8+ con acción citotóxica¹⁶⁻¹⁹ y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos por parte del trastuzumab^{23,24}.

Así, en nuestro trabajo, en RCp hay un descenso de los Tregs, monocitos y leucocitos disminuyendo su capacidad pro-tumoral^{31,46,53,54,55} y un aumento (aunque no estadísticamente significativo) de T CD8+, T CD4+⁵³ y del ratio CD8/Treg⁵⁵ ensalzando los mecanismo anti-tumorales.

Y, del mismo modo, en no RCp hay un descenso de los mecanismos anti-tumor (linfocitos B²³⁸, linfocitos NK⁵⁶⁻⁵⁸, linfocitos T CD8+^{42,47,49}, T CD4+^{42,53}, ratios linfocitos/monocitos⁵² y CD4/CD8⁵⁹⁻⁶¹) y un aumento del ratio neutrófilos/linfocitos^{62,63}, en concordancia a la literatura referenciada.

3. Correlación con la SLE y SG 9 años (Tabla 4 y figura 4).

SLE.

Los pacientes con **mayor SLE** tenían mayores niveles post-QTNA de neutrófilos ($p = 0.020$) y de linfocitos ($p = 0.011$) y menores niveles post-QTNA de monocitos ($p = 0.006$) y de Treg ($p = 0.028$) respecto a aquellos con mayor SLE.

Con el tratamiento neoadyuvante, se produce un descenso de leucocitos ($p = 0.001$), linfocitos B ($p < 0.001$), NK ($p < 0.001$) y Treg ($p = 0.033$) en los pacientes con mayor SLE; mientras que en los pacientes con menor SLE se produce un descenso de linfocitos T ($p = 0.043$), linfocitos T CD4+ ($p = 0.043$), T CD8+ ($p = 0.028$), ratios linfocitos/monocitos ($p = 0.012$) y CD4/CD8 ($p = 0.008$), y un aumento del ratio neutrófilos/linfocitos ($p = 0.038$).

SG.

Los pacientes con **mayor SG** tenían mayores niveles post-QTNA de linfocitos ($p = 0.047$) y menores niveles de Treg pre-QTNA ($p < 0.001$) y post-QTNA ($p = 0.012$).

Con el tratamiento neoadyuvante, se produce un descenso de leucocitos ($p = 0.001$), de linfocitos B ($p < 0.001$) y NK ($p < 0.001$) y un aumento del ratio CD4/CD8 ($p = 0.028$) en los pacientes con mayor SG. Mientras que en los pacientes con menor SG se produce un descenso del ratio CD4/CD8 ($p = 0.028$).

Son concordantes con la literatura los hallazgos en los pacientes de mayor supervivencia y niveles de linfocitos elevados anti-tumorales^{64,65}, menores niveles de monocitos supresores tipo TAMs^{43,44,46} y menores niveles de Treg inmunosupresores^{47-49,53,54}, así como un descenso de los Tregs, leucocitos y linfocitos B⁶⁶. Asimismo, se objetiva un descenso de las poblaciones anti-tumorales como linfocitos T totales, linfocitos T CD4+^{48,53,54,55}, T CD8+^{48,53,54}, ratios linfocitos/monocitos y CD4/CD8^{60,61} y un aumento del ratio pro-tumoral neutrófilos/linfocitos^{39,40,41,60,63} en aquellos pacientes con menor supervivencia.

Perfil inmunitario en TEJIDO.

1. Correlación con la RCp (Sistema M&P) (Tabla 3 y figura 5).

- TILs pre-QTNA.

Las pacientes que alcanzan RCp global (mama y ganglionar) tienen mayor infiltrado T CD8+ y similar infiltrado FOXP3+ comparado con no RCp global. Similares resultados se observan cuando se valora solo la RCp en mama o ganglionar para ambas poblaciones celulares.

Se ha empleado el sistema de Clasificación de Ladoire ó Black grading system para medir el infiltrado inmunitario en el TME con un máximo de 3 y un mínimo de 0:

Infiltrado T CD8+: En RCp el 66.7% (IC 95% 33.3-100) de los pacientes tenía grado 3 y el 33.3% (IC 95% 0-66.7) tenía grado 0-2 de infiltrado de linfocitos T CD8+. Mientras que en los pacientes con no RCp, sólo el 32.3% (IC 95% 16.1-48.4) tenía grado 3 y el 67.7% (IC 95% 51.6-83.9) tenía grado 0-2 de infiltrado de linfocitos T CD8+.

Infiltrado Tregs (FOXP3+): Cuando se mide la RCp, el porcentaje de pacientes con infiltrado de linfocitos Tregs (FOXP3+) grado 0-2 y grado 3 es muy similar en RCp y no RCp. Así, en RCp, el 7.1% (IC 95% 0-21.4) de los pacientes tenía grado 3 y el 92.9% (IC 95% 78.6-100) tenía grado 0-2 de infiltrado de linfocitos Tregs FOXP3+. Mientras que en no RCp, el 4.3% (IC 95% 0-13) de los pacientes tenía grado 3 y el 95.7% (IC 95% 87-100) tenía grado 0-2 de infiltrado de linfocitos Tregs FOXP3+.

Se observa una correlación entre los hallazgos de nuestro trabajo y las referencias publicadas en la literatura. Hay una mayor respuesta a la QTNA, medida por la RCp, en aquellos tumores con predominio linfocitario^{16,17} e incluso, relacionados con el subtipo de TILs presentes en el TME¹⁸⁻²². De ahí la importancia de medir los TILs en la biopsia del diagnóstico tal y como describe Salgado et al.²⁵, y aunque el autor concluye que los TILs intratumorales no aportan información adicional a los estromales, siendo éstos últimos más fáciles de evaluar, nuestros patólogos han evaluado un promedio de ambos, con resultados concordantes a la literatura en cuanto a potencial factor predictivo de respuesta a QTNA^{16,17,26,27}.

Los autores Denkert et al.^{16,26} e Issa-Nummer²⁷ evaluaron los TILs pre-QTNA, observándose una mayor tasa de RCp en aquellos tumores con predominio linfocitario, respecto a no RCp. Aunque el análisis de nuestro trabajo se ha basado en el porcentaje de pacientes con RCp que tienen un infiltrado de grado 3 vs grado 0-2, se ven resultados concordantes con estos autores con **mayor infiltrado de TILs grado 3 en aquellos pacientes con RCp vs no RCp**. Y, en concreto, vemos que **un alto infiltrado T CD8+ pre-QTNA beneficia el efecto del tratamiento para conseguir RCp**, en relación a los resultados del autor Ali et al.⁶⁶ cuando analiza en la pieza quirúrgica en pacientes no sometidos a neoadyuvancia, el papel de las antraciclinas en relación a la densidad de infiltrado T CD8+ (aunque son pacientes no sometidos a QTNA, habría una similitud en la interpretación de los resultados de TILs pre-QTNA de nuestra muestra de pacientes en neoadyuvancia, al no estar influenciados la evaluación de los TILs del TME por el tratamiento aplicado). Sin embargo, vemos que el **infiltrado FOXP3+ pre-QTNA en nuestro trabajo no tendría tanto impacto en alcanzar RCp vs no RCp**, sugiriendo que otras células del TME, tal vez los T CD8+, pudieran tener un papel más crítico, como ya proponía el autor Mahmoud et al.²⁹

□ TILs post-QTNA

Se observa un **mayor infiltrado T CD8+ respecto a FOXP3+** en todas las pacientes.

Tras la QTNA, se produce, en general, la **no modificación de la densidad de T CD8+ en RCp global, mientras que disminuyen en no RCp global**. El porcentaje de pacientes con infiltrado de linfocitos T CD8+ de grado 3 y de grado 2 se mantiene constante en RCp mientras que en no RCp se produce un ligero descenso del porcentaje de pacientes con grado 3 y aumenta el grado 0-2, haciendo que se mantenga el mayor porcentaje de pacientes con grado 3 de linfocitos T CD8+ en RCp vs no RCp. Así en RCp, el 66.7% (IC 95% 33.3-100) de los pacientes tenía grado 3 y el 33.3% (IC 95% 0-66.7) tenía grado 0-2 de infiltrado de linfocitos T CD8+. Mientras que en no RCp, el 30.3% (IC 95% 15.2-45.5) de los pacientes tenía grado 3 y el 69.7% (IC 95% 54.5-84.8) tenía grado 0-2 de infiltrado de linfocitos T CD8+ post-tratamiento.

Similares resultados se observan cuando se valora solo la RCp en mama o ganglionar para ambas poblaciones celulares.

Sin embargo, tras QTNA, y **de manera independiente a la respuesta alcanzada, se produce un descenso de la densidad de FOXP3+**. Todos los pacientes (100%) tienen grado 2 de este infiltrado celular y ninguno (0%) presenta grado 3, independientemente de la respuesta alcanzada.

Nuestros resultados de TILs post-QTNA muestran concordancia con los estudios previos en la literatura. Se ha observado en nuestro trabajo como el tratamiento oncológico neoadyuvante con quimioterapia basada en esquemas con antraciclinas, taxanos, sales de platino y trastuzumab, podría alterar el estado inflamatorio inmunitario de los tumores. Parece inducirse muerte celular o apoptosis inmunogénica con una liberación de antígenos reconocidos por las células dendríticas con la posterior activación de T CD4+ y T CD8+ con acción citotóxica que mantendrían constantes o aumentarían la densidad de los TILs T CD8+^{16-19,23,24}.

En nuestro trabajo la densidad de los linfocitos T CD8+ prácticamente se mantiene constante, no disminuyendo tras el tratamiento con QTNA en aquellos pacientes con RCp y disminuyendo en no RCp. En cambio, hay disminución de FOXP3+ independientemente de la respuesta. Estos hallazgos están en relación a esa respuesta anti-tumoral por parte de la quimioterapia. De hecho, Ladoire et al.^{18,19} muestra en la evaluación post-QTNA una no modificación de T CD3+ ni de T CD8+, y un descenso de FOXP3+, con resultado de un ratio CD8+/FOXP3+ post-QTNA elevado, asociándose con la RCp en una alta sensibilidad (75%) y especificidad (93%).

Así, la modificación de los TILs por el tratamiento oncológico, podría convertir un tumor frío y poco inmunogénico, como puede ser el carcinoma de mama, en un tumor más inmunogénico, influyendo en la respuesta a tratamiento y en el pronóstico^{16-19,23-24} como también veremos más adelante al analizar supervivencia.

2. Correlación con la SLE y SG 9 años (Tabla 4 y figura 6).

Se analizó la SLE y SG tras 9 años de seguimiento.

Un alto porcentaje de pacientes tiene densidad baja (grado 0-2) de FOXP3+ tanto pre-QTNA (89%-100%) como post-QTNA (100%), y un bajo porcentaje de pacientes tiene densidad alta (grado 3) de FOXP3+ tanto pre-QTNA (0%-10%) como post-QTNA (0%), independientemente de la SLE ó SG (> media ó < media). Esto pudiera estar en relación a la baja tasa de recaída y larga supervivencia de las pacientes en estadio no metastásico. Si bien, se ve cómo **con el tratamiento neoadyuvante, el 10% de los pacientes que presentaban densidad grado 3 de FOXP3+ pre-QTNA, bajan de densidad a 0-2 post-QTNA, consiguiéndose que el 100% de los pacientes, independientemente de la SLE ó SG, tengan grado 0-2 de FOXP3+ en relación al papel inmunomodulador favorecedor de la quimioterapia/trastuzumab.**

El porcentaje de pacientes con infiltrado de linfocitos T CD8+ en tejido pre-QTNA con grado 0-2 es el mayoritario (alrededor del 60%) y se mantiene prácticamente constante post-QTNA, independiente de la SLE ó SG (> media ó < media).

En nuestro trabajo, al igual que ocurre en el trabajo de Ladoire et al.¹⁸, el infiltrado FOXP3+ y T CD8+ pre-QTNA no se correlacionó ni con SLE ni con SG, y FOXP3+ post-QTNA tampoco se relacionó con la SG.

Sin embargo, una baja infiltración FOXP3+ post-QTNA se asoció a mejor SLE ($p = 0.036$) mientras que una alta infiltración T CD8+ post-QTNA se asoció a mejor SLE ($p < 0.0001$) y SG ($p < 0.0001$) en Ladoire et al.¹⁸, pero no en nuestro trabajo.

Lo que también destaca Ladoire et al.¹⁸ es que el ratio TCD8+/FOXP3+ post-QTNA elevado se correlaciona mejor para la SLE y SG que incluso otros factores clásicos como el TNM patológico o el empleo de quimioterapia. Así, crearon el sistema de puntuación patológico-inmunitario (PathIm) utilizando el TNM patológico post-QTNA y el ratio CD8/FOXP3+ post-QTNA para establecer el pronóstico: los pacientes con mínimo estadio TNM patológico y alto ratio CD8/FOXP3+ tuvieron una tasa de SLE a los 5 años del 96% y de SG del 100%.

Así que, ahondando en ese dato, **si tenemos en cuenta que el global de los pacientes incluidos en nuestro estudio tienen buena SLE y SG (tasa de SLE/9años del 72.3% y de SG/9años del 83.0%),**

objetivamos que, **tras QTNA, hay mayor porcentaje de pacientes con alta densidad T CD8+ que de FOXP3+**: Hasta el 40% de los pacientes tienen densidad 3 de T CD8+ post-QTNA, mientras que ninguno (0%) de los pacientes tiene densidad 3 de FOXP3+ post-QTNA.

Además, tal y como analiza Liu F et al.²², un ratio CD8/FOXP3+ elevado (elevada densidad T CD8+ y baja densidad FOXP3+), está relacionado con mejor SLE y SG, siendo mayor este ratio en subtipo luminal vs no luminal. En nuestro trabajo, un alto porcentaje de nuestra muestra es fenotipo luminal y, además, hay pocos eventos de recaída o muerte, lo que influye en los resultados de supervivencia y TILs.

Aunque no podamos sacar conclusiones más claras de nuestro estudio sobre la influencia de los TILs del TME en la supervivencia, sí que hay múltiples referencias en la literatura que apoyarían nuestra hipótesis^{22,66-68} sobre todo con el infiltrado post-QTNA¹⁸. Ali et al.⁶⁶, Liu et al.⁶⁸ y Mahmoud et al.²⁸ apoyan la idea de que una mayor densidad de T CD8+ reduce el riesgo de muerte mientras que un elevado infiltrado de FOXP3+ lo aumentaría⁶⁷.

Además, podría haber otros factores confusores para sacar conclusiones como el subtipo tumoral (RH-), grado tumoral (G3), edad (>50 años) y afectación ganglionar (N+) que pudieran influir en la supervivencia tal y como expone Ladoire et al.^{18,19,22} ó incluso que otros infiltrados celulares o moléculas co-estimuladoras o co-represoras del TME pudieran tener un papel más crítico en la supervivencia como CAFs, TAMs, TANs, MDSCs, CTLA-4 o PDL-1/PD-1^{29,69}.

CONCLUSIONES

El perfil inmunitario de las pacientes con diagnóstico de carcinoma de mama es diferente al de sanas. En las pacientes se produce un aumento del estado inflamatorio (mayores niveles de leucocitos, neutrófilos, y ratio neutrófilos/linfocitos) con aumento de los mecanismos pro-tumorales (Treg) y disminución de los anti-tumorales (linfocitos, linfocitos T, linfocitos B, T CD4+ y T CD8+, ratios linfocitos/monocitos, CD4/CD8 y CD8/Treg) respecto a sanas.

El tratamiento neoadyuvante tiene un potencial papel inmunomodulador.

En las pacientes que alcanzan **RCp**, con el tratamiento neoadyuvante se produce un **descenso en SANGRE PERIFÉRICA de las poblaciones pro-tumorales**, mientras que en **no RCp hay un descenso de las anti-tumorales**. Y del mismo modo, en **TEJIDO** hay una disminución de FOXP3+ y un mayor infiltrado de linfocitos T CD8+ en RCp.

En las pacientes que alcanzan **mayor SLE y SG**, con el tratamiento neoadyuvante se produce un **descenso en SANGRE PERIFÉRICA de las poblaciones pro-tumorales** (leucocitos y Treg) y un aumento del ratio CD4/CD8 anti-tumoral. Y del mismo modo, en **TEJIDO** hay una disminución de FOXP3+ y mayor infiltrado post-QTNA de linfocitos T CD8+ en los pacientes con una mayor SLE y SG.

Son necesarios más estudios con mayor poder estadístico para establecer definitivamente a las poblaciones celulares del sistema inmunitario como potenciales biomarcadores predictivos y pronósticos.

TABLAS

	Pacientes (N= 47) N (%)
Edad (años)	
Media	51
<50	19 (40)
≥50	28 (60)
ECOG- Performance Status	
0	40 (85)
1	5 (11)
2	2 (4)
Fenotipo tumoral	
Luminal A	6 (12)
Luminal B	19 (40)
Luminal HER2	14 (30)
HER2 puro	4 (9)
Triple negative	4 (9)
Cirugía mama	
Tumorectomía	19 (40)
Mastectomía	28 (60)
Cirugía axilar	
BSGC pre-QTNA	12 (27)
N0	10 (21)
N+	2 (4)
Linfadenectomía post-QTNA	37 (79)
1-3 ganglios resecaos	3 (6)
4-9 ganglios resecaos	5 (11)
>10 ganglios resecaos	29 (62)
Recaída	
Si	13 (28)
<5 años	10 (22)
5-9 años	3 (6)
No	34 (72)
Recaída visceral	
Si	11 (24)
No	2 (4)
Localización recaída	
Pulmonar	2 (4)
Hepática	8 (17)
SNC	1 (2)
Ósea	8 (17)
Ganglionar	4 (8)
Cutánea-Subcutánea	5 (11)
Mama contralateral	1(2)
Nº sitios recaída	
1	2 (4)
2	6 (13)
3	4 (8)
>3	1 (2)
Exitus	
Si	7 (15)
<5 años	5 (11)
5-9 años	2 (4)

No Desconocido	39 (83) 1 (2)
Causa exitus	
Progresión enfermedad	6 (13)
Toxicidad	0 (0)
Otras	1 (2)

Tabla 1. Características clínico-epidemiológicas de la cohorte de pacientes.

MEDIANAS Y RATIOS	PACIENTES	SANAS	p
Leucocitos	9050	6825	0.004
Neutrófilos	6000	3625	<0.001
LTreg	93	65	0.028
Ratio NL	4.34	1.76	<0.001
Linfocitos	1120	2090	<0.001
LT	890	1610	<0.001
LB	147	199	0.009
LT CD4+	476	968	<0.001
LT CD8+	299	467	0.001
Ratio LM	3.18	4.38	0.018
Ratio CD4/CD8	1.63	2.15	0.003
Ratio CD8/Treg	2.4	5.13	<0.001
Monocitos	450	530	0.336
LNK	201	246	0.566

Tabla 2. Medianas (IC 95%) de niveles (cels/ul) basales de poblaciones celulares del sistema inmunitario en sangre periférica en sanas versus pacientes

		MAMA		AXILA		MAMA+AXILA	
		RCp	No RCp	RCp	No RCp	RCp	No RCp
Leucoc. totales	Basal	6740 (5700-10080)	9680 (8690-11700)	6235 (5430-7950)	9415 (6590-12080)	6135 (4050-7340)	9505 (8781-11846)
	C3	7620 (4500-9500)	8900 (8600-10600)	7750 (4100-10000)	9710 (8389-12800)	8300 (5500-11800)	8900 (8470-10155)
	C6	4060 (1057-6525)	5840 (2340-7900)	2820 (1180-5300)	7760 (6098-8400)	5300 (2820-6400)	5740 (3021-7620)
Neutróf.	Basal	5515 (3180-7150)	7710 (5310-10415)	4370 (3180-5560)	7150 (4970-10350)	3775 (2150-5515)	7335 (5245-10470)
	C3	7280 (5420-7930)	7410 (6910-8510)	6850 (4235-7545)	7410 (5110-10290)	5780 (2620-6930)	7850 (7050-10430)
	C6	5310 (1410-7660)	6140 (5633-7130)	4160 (1354-5310)	6060 (5633-7035)	4350 (1410-5310)	6060 (5475-7185)
Linfocitos totales	Basal	950 (750-1570)	1182 (1020-1760)	1270 (740-2100)	1545 (1270-1820)	1030 (750-1730)	1220 (970-1755)
	C3	930 (830-1050)	930 (730-1090)	1000 (400-1600)	1135 (820-1450)	955 (760-1100)	930 (600-1090)
	C6	610 (227-785)	380 (168-760)	485 (230-740)	240 (100-380)	640 (820-105)	470 (168-760)
Monocitos	Basal	335 (230-400)	460 (360-660)	320 (270-450)	550 (330-710)	335 (250-420)	460 (360-660)
	C3	320 (290-410)	385 (305-650)	370 (295-540)	480 (340-690)	335 (265-495)	400 (340-660)
	C6	210 (175-315)	340 (270-540)	210 (150-320)	510 (370-720)	200 (150-220)	370 (310-570)
Linfocitos T	Basal	606 (403-968)	988 (728-1249)	649 (428-943)	889 (528-1178)	628 (456-1086)	807 (690-1096)
	C3	655 (525-746)	717 (570-823)	636 (437-759)	746 (545-836)	721 (574-810)	717 (566-810)
	C6	501 (400-882)	583 (319-710)	631 (393-800)	517 (247-774)	662 (404-882)	517 (319-691)
Linfocitos B	Basal	158 (105-241)	160 (136-222)	156 (97-231)	157 (134-236)	146 (99-232)	147 (136-212)
	C3	83 (46-125)	75 (40-103)	72 (46-117)	69 (32-112)	97 (48-127)	49 (53-94)
	C6	52 (17-85)	27 (17-38)	31 (6-46)	25 (17-42)	52 (46-74)	25 (16-38)
Linfocitos NK	Basal	196 (154-251)	212 (186-259)	197 (139-274)	217 (188-267)	193 (135-267)	212 (186-262)
	C3	168 (121-218)	147 (132-191)	181 (140-228)	147 (132-211)	218 (140-290)	147 (132-192)
	C6	124 (80-183)	127 (97-183)	178 (156-226)	110 (87-132)	156 (95-219)	125 (99-168)
Linfocitos T CD4	Basal	260 (207-308)	410 (231-508)	315 (222-442)	406 (220-616)	360 (207-575)	414 (228-534)
	C3	338 (236-420)	337 (211-414)	384 (262-450)	354 (279-479)	408 (266-499)	362 (228-422)
	C6	253 (111-413)	296 (151-382)	327 (111-483)	351 (255-402)	276 (111-483)	296 (222-382)
Linfocitos T CD8	Basal	249 (172-361)	308 (228-458)	235 (147-308)	255 (216-493)	298 (154-425)	300 (226-400)
	C3	232 (195-310)	217 (177-252)	208 (176-241)	233 (177-355)	237 (195-331)	222 (195-283)
	C6	286 (209-384)	176 (122-295)	207 (108-357)	230 (133-348)	327 (215-377)	183 (133-295)
Linfocitos Treg	Basal	77 (40-126)	80 (49-154)	80 (40-125)	102 (63-161)	79 (40-107)	103 (70-161)
	C3	75 (43-139)	50 (33-91)	50 (33-97)	78 (44-105)	60 (33-109)	72 (36-105)
	C6	61 (24-111)	67 (38-116)	35 (24-52)	100 (83-125)	25 (12-43)	99 (67-122)
CD8 tejido	Antes	G 0-2: 33.3 (0-66.7) G 3: 66.7 (33.3-100)	G 0-2: 70 (53.3-86.7) G 3: 30 (13.3-46.7)	G 0-2: 38.5 (15.4-61.5) G 3: 61.5 (38.5-84.6)	G 0-2: 66.7 (12.1-40) G 3: 33.3 (13.3-40)	G 0-2: 33.3 (0-66.7) G 3: 66.7 (33.3-100)	G 0-2: 67.7 (51.6-83.9) G 3: 32.3 (16.1-48.4)
	Después	G 0-2: 44.4 (11.1-77.8) G 3: 55.6 (22.2-88.9)	G 0-2: 68.8 (53.1-84.4) G 3: 31.3 (15.6-46.9)	G 0-2: 46.2 (23.1-69.2) G 3: 53.8 (30.8-76.9)	G 0-2: 64.7 (41.2-88.2) G 3: 35.3 (11.8-58.8)	G 0-2: 33.3 (0-66.7) G 3: 66.7 (33.3-100)	G 0-2: 69.7 (51.6-84.8) G 3: 30.3 (15.1-48.4)
FOXP3 tejido	Antes	G 0-2: 77.8 (44.4-100) G 3: 22.2 (0-55.6)	G 0-2: 96.7 (90-100) G 3: 3.3 (0-10)	G 0-2: 92.3 (76.9-100) G 3: 7.7 (0-23.1)	G 0-2: 93.3 (80-100) G 3: 6.7 (9-20)	G 0-2: 83.3 (50-100) G 3: 16.7 (0-50)	G 0-2: 96.8 (90.3-100) G 3: 3.2 (0-9.7)
	Después	G 0-2: 100 G 3: 0	G 0-2: 100 G 3: 0	G 0-2: 100 G 3: 0	G 0-2: 100 G 3: 0	G 0-2: 100 G 3: 0	G 0-2: 100 G 3: 0

Tabla 3. Evolución con el tratamiento neoadyuvante de las poblaciones celulares medidas en sangre periférica y en tejido según respuesta patológica evaluada por sistema de Miller & Payne. Los valores de T CD8+ y FOXP3+ en tejido representa el porcentaje e IC 95% de pacientes con una determinada gradación (G) según sistema Ladoire (0-3). El resto de las poblaciones linfocitarias medidas en sangre periférica están representadas con valores de mediana (células/ul) e IC 95%. RCp, respuesta completa patológica; C3, ciclo 3; C6, ciclo 6; G, grado según sistema de Ladoire.

		SLE y SLED		SG	
		>Media	<Media	>Media	<Media
Leucocitos totales	Basal	9330 (7100-11700)	6760 (5700-9100)	9505 (7730-11750)	6675 (5695-9100)
	C3	9500 (8340-11380)	8500 (7570-10650)	8900 (8340-10000)	8900 (6050-10700)
	C6	4400 (1232-6875)	7225 (5115-8150)	4700 (1270-6650)	7490 (6830-8400)
Neutrófilos	Basal	7520 (5470-10470)	5540 (3510-6115)	7250 (5515-10475)	4970 (3510-7450)
	C3	7910 (7030-8840)	7090 (6650-7930)	7910 (7090-8690)	7050 (5110-9160)
	C6	6630 (5475-7740)	4985 (3205-5970)	6070 (5310-7560)	5830 (4980-6330)
Linfocitos totales	Basal	1150 (820-1435)	1390 (1170-1890)	1080 (820-1530)	1390 (1170-1890)
	C3	900 (730-980)	1030 (600-1330)	910 (790-1040)	980 (540-1350)
	C6	560 (259-740)	142 (106-274)	425 (245-695)	142 (112-368)
Monocitos	Basal	390 (320-450)	550 (340-705)	395 (325-450)	495 (330-635)
	C3	345 (280-485)	565 (335-875)	345 (300-600)	350 (280-655)
	C6	310 (205-350)	620 (445-865)	310 (240-515)	380 (109-770)
Linfocitos T	Basal	712 (493-1024)	1100 (728-1275)	712 (485-1025)	1096 (807-1275)
	C3	610 (459-726)	745 (590-979)	651 (545-742)	700 (318-1066)
	C6	500 (386-664)	806 (691-1045)	517 (386-691)	1008 (472-1546)
Linfocitos B	Basal	146 (122-168)	168 (132-246)	149 (103-205)	139 (103-178)
	C3	49 (41-72)	108 (35-146)	50 (40-74)	74 (18-113)
	C6	24 (10-46)	36 (26-69)	34 (17-46)	28 (17-78)
Linfocitos NK	Basal	201 (158-257)	162 (109-242)	195 (179-225)	206 (129-267)
	C3	156 (121-205)	147 (119-186)	162 (133-205)	146 (102-142)
	C6	120 (85-168)	180 (109-233)	136 (94-189)	144 (34-205)
Linfocitos T CD4	Basal	414 (260-590)	575 (406-763)	373 (261-534)	616 (511-853)
	C3	346 (262-414)	422 (228-513)	363 (279-418)	422 (212-614)
	C6	274 (180-366)	431 (339-695)	296 (230-382)	494 (271-707)
Linfocitos T CD8	Basal	239 (195-312)	380 (222-511)	290 (206-425)	308 (226-416)
	C3	208 (170-226)	279 (200-361)	222 (195-267)	216 (113-405)
	C6	191 (128-276)	327 (232-389)	255 (183-336)	336 (171-487)
Linfocitos Treg	Basal	77 (54-126)	100 (47-146)	70 (40-92)	155 (121-224)
	C3	49 (41-72)	94 (36-147)	49 (33-96)	108 (50-152)
	C6	43 (28-69)	108 (76-135)	48 (21-83)	127 (116-143)
CD8 tejido	Antes	G 0-2: 64.3 (46.4-82.1) G 3: 35.7 (17.9-53.6)	G 0-2: 58.3 (33.3-83.3) G 3: 41.7 (16.7-66.7)	G 0-2: 60.6 (42.4-75.8) G 3: 39.4 (24.2-57.6)	G 0-2: 71.4 (42.9-100) G 3: 28.6 (0-57.1)
	Después	G 0-2: 65.5 (48.3-82.8) G 3: 34.5 (17.2-51.7)	G 0-2: 58.3 (33.3-83.3) G 3: 41.7 (16.7-66.7)	G 0-2: 64.7 (47.1-79.4) G 3: 35.3 (20.6-52.9)	G 0-2: 57.1 (14.3-85.7) G 3: 42.9 (14.3-85.7)
FOXP3 tejido	Antes	G 0-2: 89.3 (75.0-100) G 3: 10.7 (0-25.0)	G 0-2: 100 G 3: 0	G 0-2: 90.6 (78.1-100) G 3: 9.4 (0-21.9)	G 0-2: 100 G 3: 0
	Después	G 0-2: 100 G 3: 0	G 0-2: 100 G 3: 0	G 0-2: 100 G 3: 0	G 0-2: 100 G 3: 0

Tabla 4. Evolución con el tratamiento neoadyuvante de las poblaciones celulares medidas en sangre periférica y en tejido según supervivencia (SLE y SG). Los valores de T CD8+ y FOXP3+ en tejido representa el porcentaje e IC 95% de pacientes con una determinada gradación (G) según sistema Ladoire (0-3). El resto de las poblaciones linfocitarias medidas en sangre periférica están representadas con valores de mediana (células/ul) e IC 95%. SLE, supervivencia libre de enfermedad; SLED, supervivencia libre de enfermedad a distancia; SG, supervivencia global; C3, ciclo 3; C6, ciclo 6; G, grado según sistema de Ladoire.

*La SLE y SLED son similares, a diferencia de un paciente, por lo que se ha realizado en análisis de las poblaciones celulares en conjunto para SLE y SLED.

FIGURAS

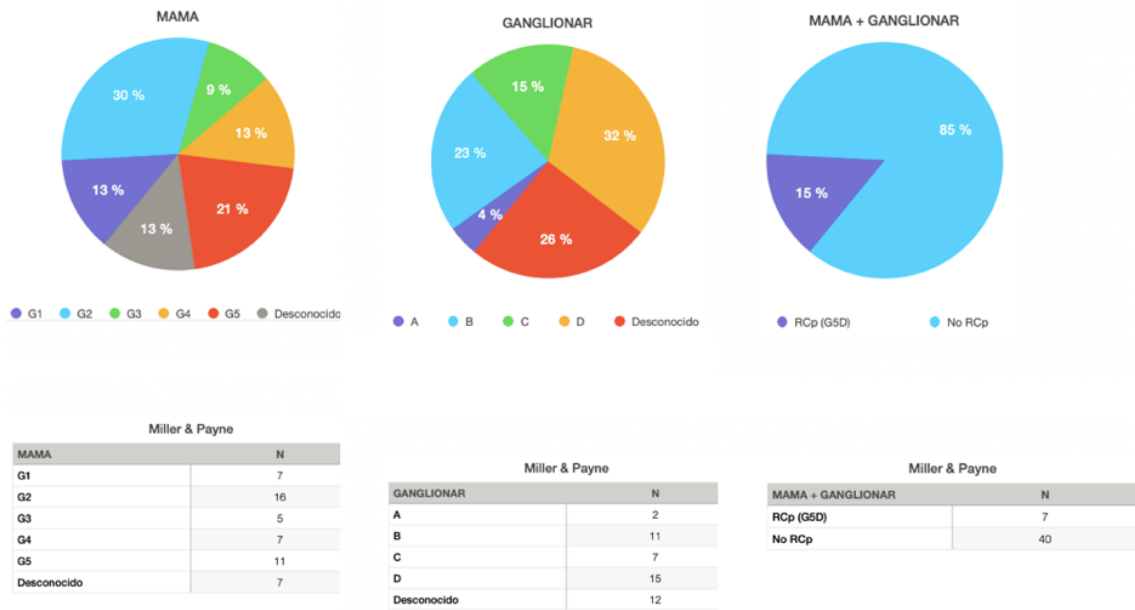


Figura 1. Respuesta según Sistema de Miller & Payne.

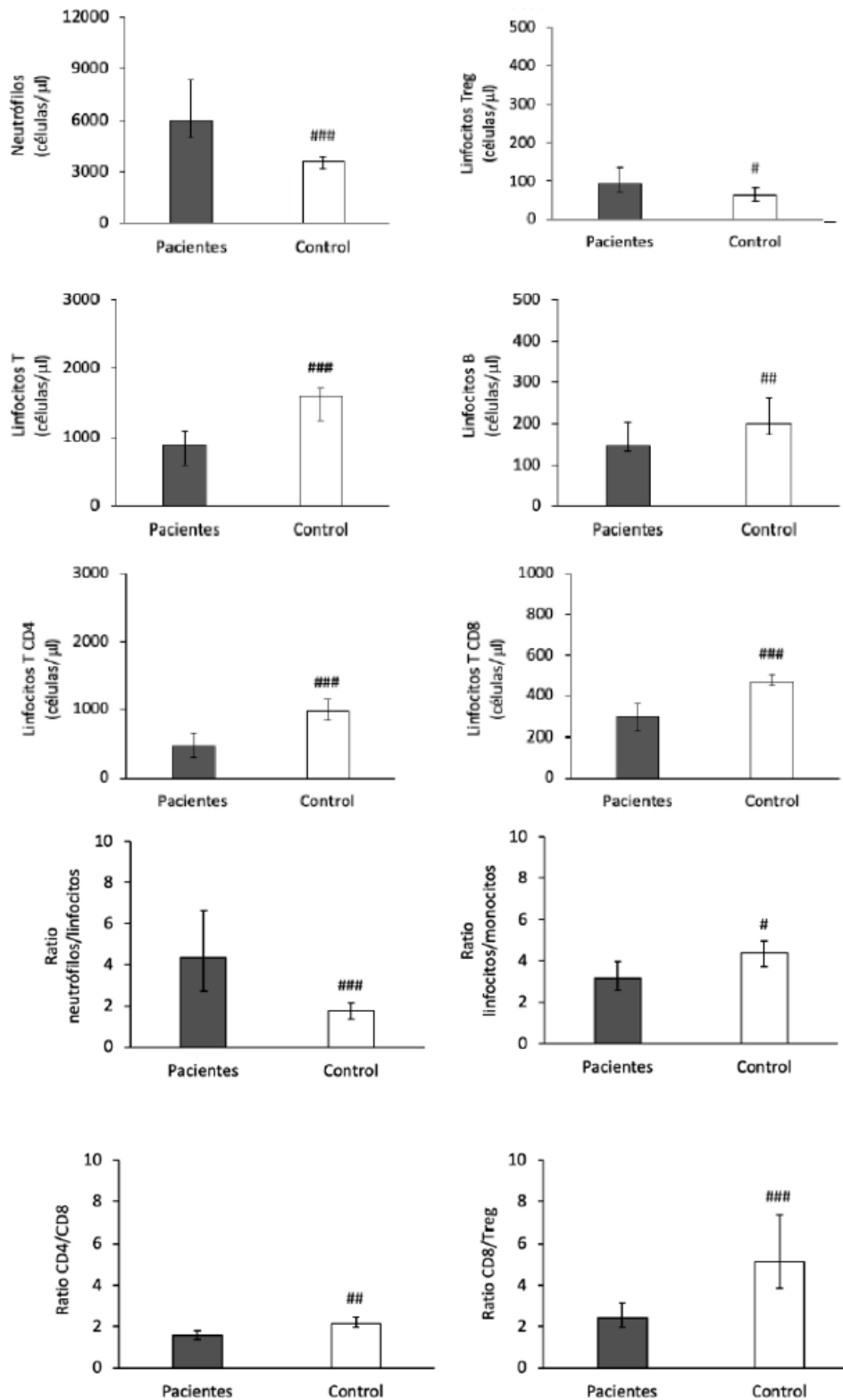


Figura 2. Medianas (IC 95%) de niveles (cels/ μ l) y ratios basales de poblaciones celulares del sistema inmunitario en sangre periférica en sanas versus pacientes. #, ## y ###, $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$ y $p \leq 0.001$, respectivamente, comparativa con pacientes. *Se han empleado diferentes escalas.*

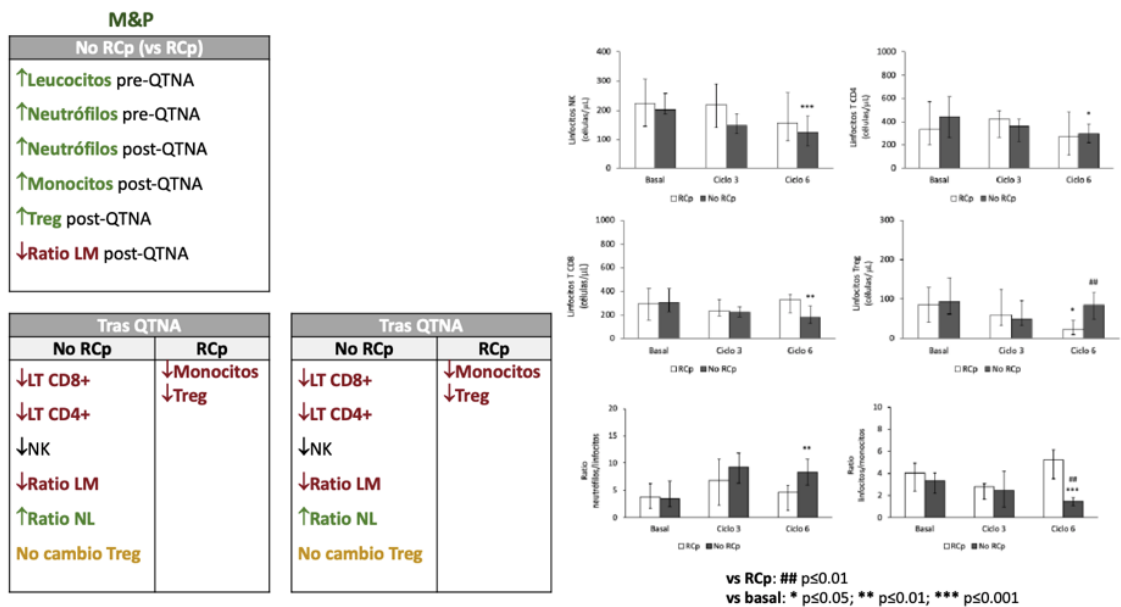


Figura 3. Evolución de las poblaciones celulares en sangre periférica (células/ul) antes, durante y después (basal, ciclo 3 y ciclo 6) del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante según respuesta patológica global (Sistema de gradación de Miller & Payne). *, ** y ***, p<0.05, p<0.01 y p<0.001, respectivamente, comparativa con basal. #, ##, ###, p<0.05, p<0.01 y p<0.001, respectivamente, comparativa con RCp. Se han empleado diferentes escalas. Sólo se representan las poblaciones celulares más representativas.

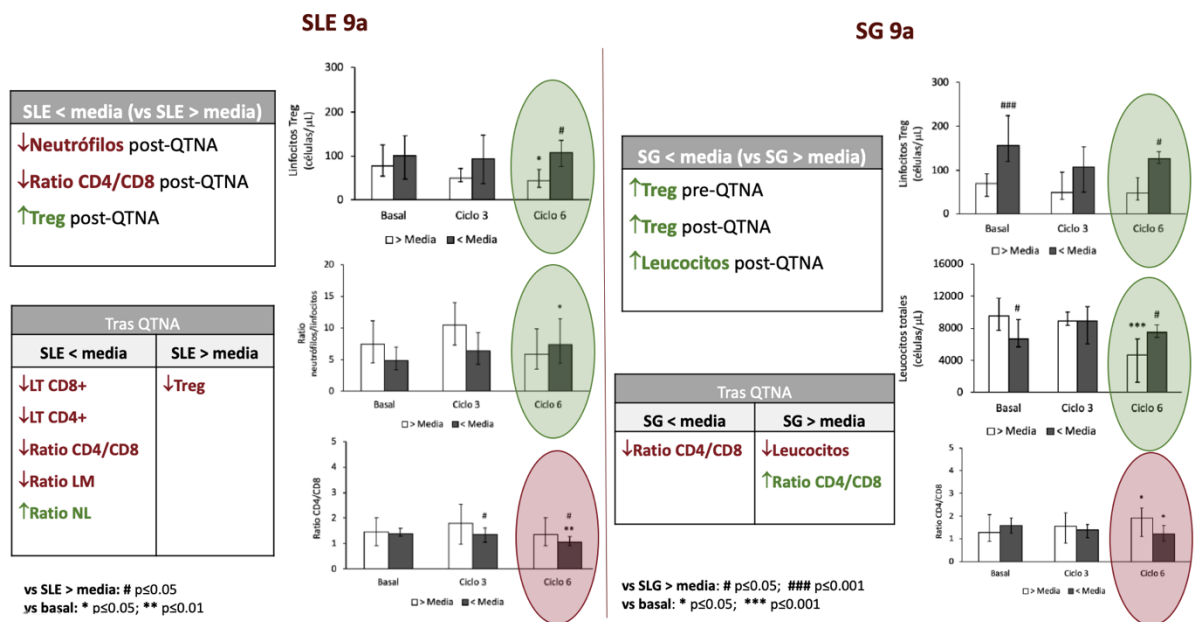


Figura 4. Niveles de las poblaciones celulares en sangre periférica (células/ul) y ratios antes, durante y después (basal, ciclo 3 y ciclo 6) del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante según supervivencia libre de enfermedad (SLE) y supervivencia global (SG). *, ** y ***, p<0.05, p<0.01 y p<0.001, respectivamente, comparativa con basal. # y ##, p<0.05 y p<0.01, comparativa con > media. Se han empleado diferentes escalas. Sólo se representan las poblaciones celulares más representativas.

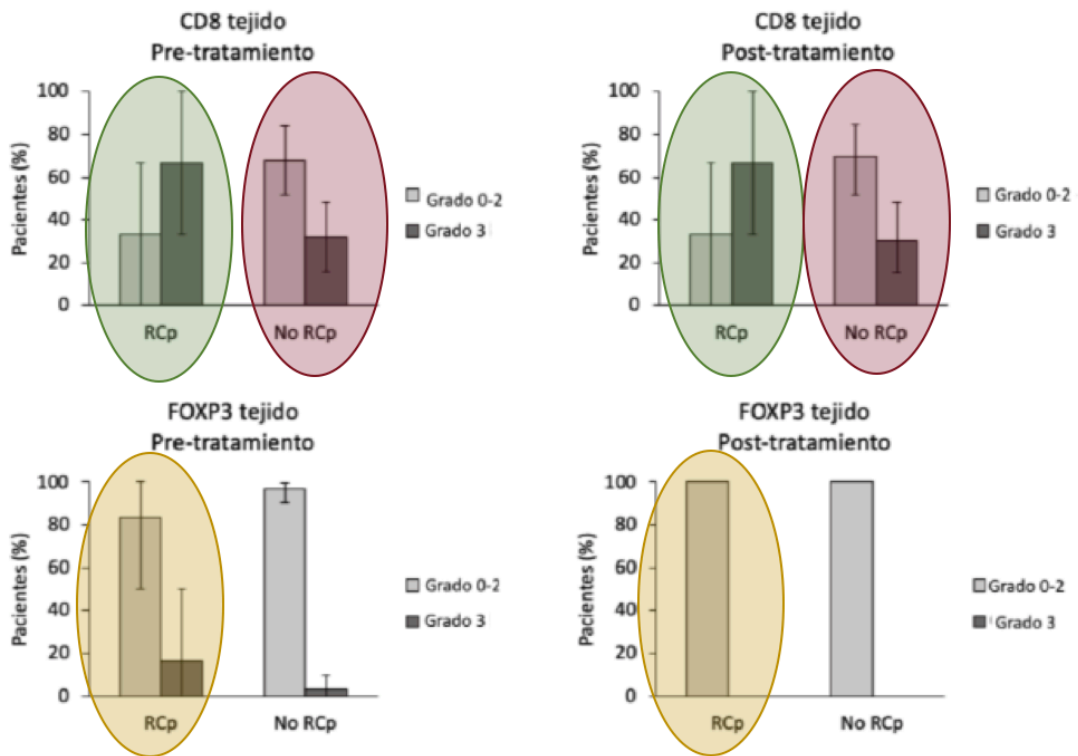


Figura 5. Evolución de las poblaciones celulares de linfocitos T CD8 y FOXP3 en tejido medidas por sistema gradación de Ladoire (0-3) antes (biopsia al diagnóstico) y después (pieza quirúrgica) del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante según respuesta patológica en mama y ganglionar (sistema de Miller & Payne).

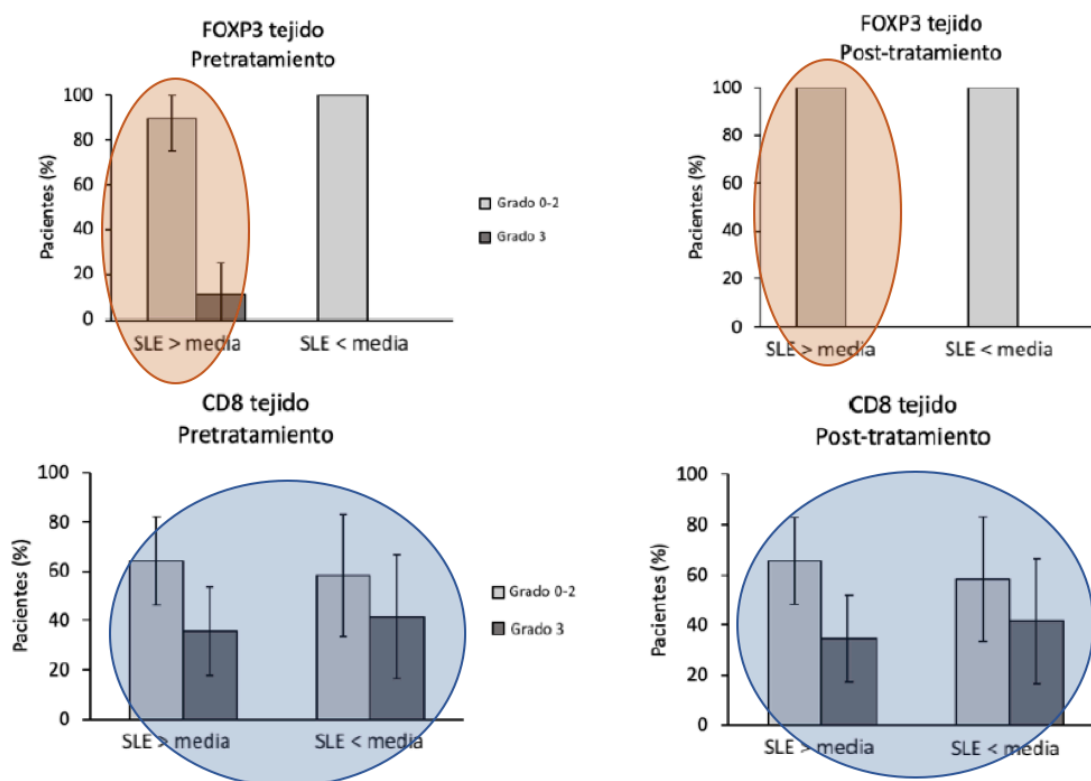


Figura 6. Evolución de las poblaciones celulares de linfocitos T CD8+ y FOXP3+ en tejido medidas por sistema gradación de Ladoire (0-3) antes (biopsia al diagnóstico) y después (pieza quirúrgica) del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante según supervivencia libre de enfermedad (SLE). Se observan similares valores en SG.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kesson EM, Allardice GM, George WD, et al. Effects of multidisciplinary team working on breast cancer survival: retrospective, comparative, interventional cohort study of 13 722 women. *BMJ* 2012; 344: e2718.
2. van Nes JG, Putter H, Julien JP, et al. Preoperative chemotherapy is safe in early breast cancer, even after 10 years of follow-up; clinical and translational results from the EORTC trial 10902. *Breast Cancer Res Treat*, 2009;115 (1);101-113.
3. Fisher B, Bryant J, Wolmark N, et al. Effect of preoperative chemotherapy on the outcome of women with operable breast cancer. *J Clin Oncol*. 1998;16 (8): 2672-2685.
4. Bear HD, Anderson S, Brown A, 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):4165-4174.
5. Kuerer HM, Newman LA, Smith TL, et al. Clinical course of breast cancer patients with complete pathologic primary tumor and axillary lymph node response to doxorubicin-based neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol*.1999;17 (2):460-469.
6. Cortazar P, Zhang L, Untch M, et al. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *Lancet* 2014; 384:164.
7. Von Minckwitz G, Untch M, Blohmer JU, 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): 1796-1804.
8. Colleoni M, Viale G, Zahrieh D, et al. Chemotherapy is more effective in patients with breast cancer not expressing steroid hormone receptors: a study of preoperative treatment. *Clin Cancer Res*. 2004;10(19):6622
9. Amin MB, et al., editors. *AJCC cancer staging manual*. 8th ed. Basel: Springer; 2017: 588–636.
10. Ogston KN, Miller ID, Payne S, et al. A new histological grading system to assess response of breast cancers to primary chemotherapy: prognostic significance and survival. *Breast* 2003; 12:320–327.
11. Symmans WF, Peintinger F, Hatzis C, et al. Measurement of residual breast cancer burden to predict survival after neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol*.2007;25:4414-22.
12. Johansson M, Denardo DG, Coussens LM. Polarized immune responses differentially regulate cancer development. *Immunol. Rev*. 2008;222,145–154.
13. Swann JB, Smyth MJ. Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest*. 2007; 117(5):1137–46.
14. Yamaguchi R, Perkins G. An Emerging Model for Cancer Development from a Tumor Microenvironment Perspective in Mice and Humans. En: Alexander Birbrair, ed. *Tumor Microenvironment. Recent Advances*. Springer 2020;19-30.
15. Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*. 2007;121(1):1–14.
16. Denkert C, Loibl S, Noske A, et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2010; 28:105-13.
17. Hornychova H, Melichar B, Tomsova M, Mergancova J, Urminska H, Ryska A. Tumor-infiltrating lymphocytes predict response to neoadjuvant chemotherapy in patients with breast carcinoma. *Cancer Invest*. 2008; 26:1024-31.
18. Ladoire S, Arnould L, Apetoh L, et al. Pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy of breast carcinoma is associated with the disappearance of tumor-infiltrating foxp3+ regulatory T cells. *Clin Cancer Res* 2008; 14:2413–2420.
19. Ladoire S, Mignot G, Dabakuyo S, et al. In situ immune response after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer predicts survival. *J Pathol*. 2011; 224:389-400.
20. Bates GJ, Fox SB, Han C, Leek RD. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J Clin Oncol*. 2006; 24: 5373-80.
21. Douglass S, Ali S, Meeson AP, Browell D, Kirby JA. The role of FOXP3 in the development and metastatic spread of breast cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2012; 31:843-54.
22. Liu F, Lang R, Zhao J, et al. CD8+ cytotoxic T cell and FOXP3+ regulatory T cell infiltration in relation to breast cancer survival and molecular subtypes. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 130:645–655.

23. Tamura K, Shimizu C, Hojo T, et al. FcgammaR2A and 3A polymorphisms predict clinical outcome of trastuzumab in both neoadjuvant and metastatic settings in patients with HER2-positive breast cancer. *Ann Oncol* 2011; 22(6):1302-7.
24. Gennari R, Menard S, Fagnoni F, et al. Pilot study of the mechanism of action of preoperative trastuzumab in patients with primary operable breast tumors overexpressing HER2. *Clin Cancer Res* 2004; 10:5650–5655.
25. Salgado R, Denkert C, Demaria S, et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol* 2015; 26:259-71.
26. Denkert C, Minckwitz G von, Brase JC, Sinn BV, 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; 33:983-91.
27. Issa-Nummer, Darb-Esfahani S, Loibl S, et al. Prospective Validation of Immunological Infiltrate for Prediction of Response to Neoadjuvant Chemotherapy in HER2-Negative Breast Cancer – A Substudy of the Neoadjuvant GeparQuinto Trial. *PLoS One*. 2013; 8(12): e79775.
28. Mahmoud SM, Paish EC, Powe DG et al. Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J Clin Oncol* 2011; 29:1949–1955.
29. Mahmoud SM, Paish EC, Powe DG et al. An evaluation of the clinical significance of FOXP3+ infiltrating cells in human breast cancer. *BreastCancer Res Treat* 2011; 127:99–108.
30. Remon J, García-Campelo R, de Álava E, et al. Liquid biopsy in oncology: a consensus statement of the Spanish Society of Pathology and the Spanish Society of Medical Oncology. *Clin Transl Oncol* 2019. <https://doi.org/10.1007/s12094-019-02211-x>.
31. Granger JM, Kontoyiannis DP. Etiology and outcome of extreme leukocytosis in 758 nonhematologic cancer patients: a retrospective, single-institution study. *Cancer*. 2009;115(17):3919-3923.
32. Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest*.2000;80(5):617-53.
33. Shoenfeld Y, Tal A, Berliner S, Pinkhas J. Leukocytosis in non hematological malignancies--a possible tumor-associated marker. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1986;111(1):54-58.
34. Yang L, Liu Q, Zhang X, et al. DNA of neutrophil extracellular traps promotes cancer metastasis via CCDC25. *Nature* 2020; 583:133–138.
35. Li CH, Kuo WH, Chang WC, Huang SC, Chang KJ, Sheu BC. Activation of regulatory T cells instigates functional down-regulation of cytotoxic T lymphocytes in human breast cancer. *Immunol Res*. 2011;51(1):71-79.
36. Wang ZK, Yang B, Liu H, et al. Regulatory T cells increase in breast cancer and in stage IV breast cancer. *CancerImmunolImmunother*. 2012;61(6):911-916.
37. Liu JT, Yue J, Ren XB, Li H. Measurement of CD4+CD25+ T cells in breast cancer patients and its significance. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*. 2005;27(7):423-425.
38. Lijanage UK, Moore TT, Joo HG, et al. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol*. 2002;169(5):2756-2761.
39. Cho U, Park HS, Im SY, et al. Prognostic value of systemic inflammatory markers and development of a nomogram in breast cancer. *PLoS ONE* 2018; 13(7): e0200936.
40. Marin Hernandez C, Pinero Madrona A, Gil Vazquez PJ, et al. Usefulness of lymphocyte-to-monocyte, neutrophil-to-monocyte and neutrophil-to-lymphocyte ratios as prognostic markers in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Clin Transl Oncol*. 2018; 20:476–83.
41. Losada B, Guerra JA, Malón D, et al. Pretreatment neutrophil/lymphocyte, platelet/lymphocyte, lymphocyte/monocyte, and neutrophil/monocyte ratios and outcome in elderly breast cancer patients. *ClinTranslOncol* 2019; 21:855–863.
42. Song G, Wang X, Jia J, et al. Elevated level of peripheral CD8(+) CD28(-) T lymphocytes are an independent predictor of progression-free survival in patients with metastatic breast cancer during the course of chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2013;62(6):1123-1130.
43. Wen J, Ye F, Huang X, et al. Prognostic Significance of Preoperative Circulating Monocyte Count in Patients With Breast Cancer Based on a Large Cohort Study. *Medicine* 94(49):e2266.

44. Tiainen S, Tumelius R, Rilla K, Hämäläinen K, Tammi M, Tammi R, Kosma VM, Oikari S and Auvinen P: High numbers of macrophages, especially M2-like (CD163-positive), correlate with hyaluronan accumulation and poor outcome in breast cancer. *Histopathology*.2015; 66:873–883.
45. Zhang B, Cao M, He Y, et al. Increased circulating M2-like monocytes in patients with breast cancer. *Tumour Biol* 2017 Jun;39(6):1010428317711571.
46. Ni X-J, Zhang X-L, Ou-Yang Q-W, et al. An Elevated Peripheral Blood Lymphocyte-to-Monocyte Ratio Predicts Favorable Response and Prognosis in Locally Advanced Breast Cancer following Neoadjuvant Chemotherapy. *PLoS ONE* 2014; 9(11): e111886.
47. Huang Y, Ma C, Zhang Q, et al. CD4+ and CD8+ T cells have opposing roles in breast cancer progression and outcome. *Oncotarget*. 2015;6(19):17462-17478.
48. Fu G, Miao L, Wang M, et al. The Postoperative Immunosuppressive Phenotypes of Peripheral T Helper Cells Are Associated with Poor Prognosis of Breast Cancer Patients. *ImmunolInvest*. 2017;46(7):647-662.
49. Bailur JK, Gueckel B, Derhovannessian E, Pawelec G. Presence of circulating Her2-reactive CD8+ T-cells is associated with lower frequencies of myeloid-derived suppressor cells and regulatory T cells, and better survival in older breast cancer patients. *Breast Cancer Res*. 2015;17(1):34.
50. Galdiero MR, Bonavita E, Barajon I, et al. Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer *Immunobiology* 2013;218(11):1402–10.
51. Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol*. 2013;12(4): 253–268.
52. Xiao-Jian N, Xiao-Lan Z, Qian-Wen OY, et al. An elevated peripheral blood lymphocyte-to-monocyte ratio predicts favorable response and prognosis in locally advanced breast cancer following neoadjuvant chemotherapy. *PLoS One*. 2014;9(11): e111886.
53. Chen R, Chen GP, Wang JH, Chen JM, Lin MQ. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*. 2019;41(11):849-853.
54. Shao B, Li HP, DI LJ, et al. Predictive and prognostic value of monitoring lymphocyte subsets in peripheral blood before and after chemotherapy in patients with metastatic breast cancer. *Beijing Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2016;48(2):304-309.
55. Sánchez-Margalet V, Barco-Sánchez A, Vilariño-García T, et al. Circulating regulatory T cells from breast cancer patients in response to neoadjuvant chemotherapy. *Transl Cancer Res* 2019;8(1):59-65.
56. Holl EK, Frazier VN, Landa K, Beasley GM, Hwang ES, Nair SK. Examining Peripheral and Tumor Cellular Immunome in Patients With Cancer. *Front Immunol*. 2019;10:1767.
57. Verma C, Kaewkangsadan V, Eremin JM, et al. Natural killer (NK) cell profiles in blood and tumour in women with large and locally advanced breast cancer (LLABC) and their contribution to a pathological complete response (PCR) in the tumour following neoadjuvant chemotherapy (NAC): differential restoration of blood profiles by NAC and surgery. *J Transl Med*. 2015;13:180.
58. Foulds GA, Vadakekolathu J, Abdel-Fatah TMA, et al. Immune Phenotyping and Transcriptomic Profiling of Peripheral Blood Mononuclear Cells From Patients With Breast Cancer: Identification of a 3 Gene Signature Which Predicts Relapse of Triple Negative Breast Cancer. *Front Immunol*. 2018;9:2028.
59. Nasr Ghalib N, Nasrullayeva GM, Qaziyev AY, Al-Ali Jawad KH. T- Lymphocyte Subset (CD4 /CD8) Ratios of Breast Cancer Patients in Basra-Iraq and Baku-Azerbaijan. *AsianPac J CancerPrev*. 2016;17(S3):175-177.
60. Sevcíková L, Hunáková L, Chorváth B, Turzová M, Boljesíková E. T-lymphocyte subsets (CD4/CD8 ratio) in breast cancer patients. *Neoplasma*. 1992;39(4):219-222.
61. Bilik R, Mor C, Hazaz B, Moroz C. Characterization of T-lymphocyte subpopulations infiltrating primary breast cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 1989;28(2):143-147.
62. Asano Y, Kashiwagi S, Onoda N, et al. Predictive value of neutrophil/lymphocyte ratio for efficacy of preoperative chemotherapy in triple-negative breast cancer. *Ann Surg Oncol*. 2016; 23:1104–10.
63. Chen Y, Chen K, Xiao X, et al. Pretreatment neutrophil-to-lymphocyte ratio is correlated with response to neoadjuvant chemotherapy as an independent prognostic indicator in breast cancer patients: a retrospective study. *BMC Cancer*.2016; 16:320.

64. Papatestas AE, Kark AE. Peripheral lymphocyte counts in breast carcinoma: An index of immune competence. *Cancer* 1974; 34:2014-2017.
65. Papatestas AE, Lesnick GJ, Genkins G, Aufses AH Jr. The prognostic significance of peripheral lymphocyte counts in patients with breast carcinoma. *Cancer* 1976; 37:164-168.
66. Murta EF, de Andrade JM, Falcão RP, Bighetti S. Lymphocyte subpopulations in patients with advanced breast cancer submitted to neoadjuvant chemotherapy. *Tumori*. 2000;86(5):403-407.
67. Liu S, Foulkes WD, Leung S, et al. Prognostic significance of FOXP3+ tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer depends on estrogen receptor and human epidermal growth factor receptor-2 expression status and concurrent cytotoxic T-cell infiltration. *Breast Cancer Res*. 2014 Sep 6;16(5):432.
68. Liu S, Lachapelle J, Leung S et al. CD8+ lymphocyte infiltration is an independent favorable prognostic indicator in basal-like breast cancer. *BreastCancer Res* 2012; 14: R48.
69. Hendrickx W, Simeone I, Anjum S, et al. Identification of genetic determinants of breast cancer immune phenotypes by integrative genome-scale analysis. *Oncoimmunology* 2017; 6(2): e1253654.

