



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)


**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma  
de Barcelona**

TESIS DOCTORAL



**EVALUACIÓN INMUNOGÉNICA DE LOS  
TUMORES DE MAMA TRIPLE NEGATIVOS EN  
RELACIÓN A LA PRESENCIA O NO DE  
LINFOCITOS INTRATUMORALES**

**Ángela Quintana Vega**

Directores: **Javier Cortés Castán**  
**Eva Muñoz Couselo**  
**Vicente Peg Cámara**

Tutor: **Albert Selva O'Callaghan**

Universidad Autònoma de Barcelona  
Programa de Doctorado en Medicina  
Departamento de Medicina

Barcelona, Junio de 2019





**Universitat Autònoma  
de Barcelona**

TESIS DOCTORAL

**Evaluación inmunogénica de los tumores de  
mama triple negativos en relación a la presencia o  
no de linfocitos intratumorales**

**Ángela Quintana Vega**

Directores: **Javier Cortés Castán**  
**Eva Muñoz Couselo**  
**Vicente Peg Cámara**

Tutor: **Albert Selva O'Callaghan**

Universidad Autònoma de Barcelona  
Programa de Doctorado en Medicina  
Departamento de Medicina

Barcelona, Junio de 2019



A mis padres y hermanos



A mi abuela Mena y a mi tío Pedro







*Cabeza de toro. Picasso (1942)*

“Un día encontré, entre un montón de objetos revueltos, un sillín viejo de bicicleta justo al lado de un manillar oxidado. [...] No he hecho más que soldarlos”

### **Yo no busco, yo encuentro**

Buscar es partir de hechos conocidos y querer encontrar algo conocido en lo nuevo.

Encontrar: eso es lo totalmente nuevo, también en el movimiento.

Todos los caminos están abiertos, y lo que se encuentra es algo desconocido. Es un riesgo, una sagrada aventura.

La incertidumbre de tales riesgos solo la pueden asumir quienes se sienten protegidos en la desprotección, quienes en la incertidumbre o en la desorientación se sienten guiados, quienes en la oscuridad se abandonan a una estrella invisible y se dejan atraer por su destino en lugar de fijarlo a partir de sus limitaciones humanas.

Esta apertura hacia todo nuevo conocimiento, hacia toda nueva vivencia interior y exterior: esa es la esencia del ser humano moderno, quien, pese al miedo de ser arrastrado, experimenta, sin embargo, la gracia de sentirse amparado en la manifestación de nuevas posibilidades.

*Pablo Picasso*



## ÍNDICE

INDICE DE TABLAS .....	14
INDICE DE FIGURAS .....	15
INDICE DE FOTOS .....	18
RESUMEN .....	21
ABREVIATURAS .....	22
INTRODUCCIÓN .....	24
1. Cáncer de mama .....	24
1.1. Características .....	24
1.2. Subtipos basados en histopatología .....	26
1.3. Subtipos basados en perfiles de expresión génica .....	29
1.4. Oportunidad para la inmunoterapia .....	30
1.5. Cáncer de mama triple negativo .....	31
2. Vigilancia inmunológica para el control de los tumores .....	32
2.1. Tipos de células inmunológicas .....	34
2.1.1. Linfocitos T .....	36
2.1.1.1. Linfocitos T citotóxicos .....	36
2.1.1.2. Linfocitos T colaboradores .....	37
2.1.1.3. Linfocitos T reguladores .....	38
2.1.2. Linfocitos B .....	38
2.1.3. Células dendríticas .....	39
2.1.4. Macrófagos .....	40
2.1.5. Células asesinas .....	40
2.1.6. Células mieloides supresoras .....	41
2.2. Antígenos tumorales .....	41
2.3. Estructura de los ganglios linfáticos .....	41
2.4. Presentación de antígenos y reconocimiento inmunológico .....	44
2.5. Supresión inmunológica y desarrollo del tumor .....	45
3. Linfocitos infiltrantes del tumor en cáncer de mama .....	46
3.1. Poblaciones de linfocitos presentes en el área tumoral .....	46
3.2. Subtipos de Tumor Infiltrating Lymphocytes según su localización .....	48
3.3. Estructuras linfáticas terciarias .....	49
3.4. Guías para la evaluación de los Tumor Infiltrating Lymphocytes .....	50
4. Tumor Infiltrating Lymphocytes y su valor predictivo y pronóstico en cáncer de mama .....	53
4.1. Prevalencia en cáncer de mama .....	53

4.2. Valor pronóstico y predictivo de los Tumor Infiltrating Lymphocytes en neoadyuvancia ..	54
4.3. Valor pronóstico y predictivo de los Tumor Infiltrating Lymphocytes en adyuvancia .....	59
5. Valor pronóstico y predictivo del perfil inmunológico del ganglio linfático axilar .....	63
6. Immune checkpoints.....	64
6.1. CTLA-4.....	66
6.2. PD-1, PD-L1 y PD-L2 .....	67
6.3. OX40.....	68
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	70
7. Hipótesis .....	70
8. Objetivos .....	71
MATERIALES Y MÉTODOS .....	74
9. Pacientes y muestras .....	74
10. Pruebas.....	75
10.1. Inmunohistoquímica .....	75
10.2. Panel de expresión de genes .....	77
11. Análisis estadístico .....	80
RESULTADOS.....	82
12. Inmunohistoquímica de los receptores inmunes .....	83
12.1. Descripción de la tinción de los anticuerpos .....	85
12.1.1. Tinción de CTLA-4.....	85
12.1.2. Tinción de PD-1 .....	88
12.1.3. Tinción de PD-L1 .....	92
12.1.4. Tinción de PD-L2 .....	97
12.1.5. Tinción de OX-40.....	101
12.1. Comparación de la tinción de los biomarcadores en los ganglios linfáticos entre las pacientes con niveles altos y bajos de Tumor Infiltrating Lymphocytes .....	107
12.2. Comparación de la tinción de los biomarcadores en los centros germinales entre las pacientes con niveles altos y bajos de Tumor Infiltrating Lymphocytes .....	111
12.3. Comparación de la tinción de los biomarcadores en el tumor entre las pacientes con niveles altos y bajos de Tumor Infiltrating Lymphocytes.....	114
12.4. Comparación entre la tinción del PD-L1 en las células tumorales vs. inmunes de las pacientes con niveles altos de Tumor Infiltrating Lymphocytes .....	116
12.5. Comparación entre la tinción del PD-L1 en las células tumorales vs inmunes de las pacientes con niveles altos de Tumor Infiltrating Lymphocytes .....	116
12.6. Comparación de los ganglios linfáticos y estructuras linfáticas terciarias entre las pacientes con niveles altos y bajos de Tumor Infiltrating Lymphocytes .....	117

12.7. Misma área con diferentes anticuerpos .....	118
13. Expresión génica inmune .....	126
13.1. Comparación entre el tumor y los ganglios de los dos grupos .....	126
13.2. Comparación del tumor entre las pacientes con niveles altos y bajos de Tumor Infiltrating Lymphocytes.....	132
13.3. Comparación de los ganglios linfáticos entre las pacientes con niveles altos y bajos de Tumor Infiltrating Lymphocytes .....	139
DISCUSIÓN.....	148
CONCLUSIONES .....	167
LÍNEAS DE FUTURO .....	171
BIBLIOGRAFÍA.....	174
AGRADECIMIENTOS.....	182

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Estadios del cáncer de mama según el TNM en base a AJCC .....	26
<b>Tabla 2.</b> Clasificación del cáncer de mama según biomarcadores histopatológicos .....	27
<b>Tabla 3.</b> Subtipos de cáncer de mama según el análisis de sus perfiles de expresión génica .....	30
<b>Tabla 4.</b> Tipos de tratamientos aprobados para pacientes de cáncer de mama según su subtipo....	31
<b>Tabla 5.</b> Características de la respuesta inmune adaptativa .....	33
<b>Tabla 6.</b> Porcentaje de infiltración por linfocitos CD8+ en cada subtipo de cáncer de mama .....	47
<b>Tabla 7.</b> Recomendaciones de evaluación de los Tumor Infiltrating Lymphocytes .....	51
<b>Tabla 8.</b> Incidencia de Tumor Infiltrating Lymphocytes según el subtipo de cáncer de mama.....	53
<b>Tabla 9.</b> Resumen de los estudios neoadyuvantes que han realizado análisis de los <i>Tumor Infiltrating Lymphocytes</i> .....	55
<b>Tabla 10.</b> Resumen de los estudios neoadyuvantes que han realizado análisis de los <i>Tumor Infiltrating Lymphocytes</i> .....	60
<b>Tabla 11.</b> Resumen de las características los anticuerpos utilizados y de los diferentes reactivos, parámetros y equipos utilizados para su tinción .....	76
<b>Tabla 12.</b> Panel personalizado de 50 genes diseñado para el estudio de las muestras en la plataforma NanoString .....	79
<b>Tabla 13.</b> Variables clínicas e histopatológicas de las pacientes del estudio, según la presencia o no de <i>Tumor Infiltrating Lymphocytes</i> .....	82
<b>Tabla 14.</b> Resumen de los resultados de las comparaciones entre pacientes TILs- y TILs+ por anticuerpo y por zonas y tipo celular, expresado en mediana, rango y el valor p .....	84
<b>Tabla 15.</b> Comparación entre la expresión de PD-L1 de las células tumorales y el infiltrado linfocitario en las 15 pacientes TILs+, siendo estadísticamente significativo ( $p < 0.01$ ).....	116
<b>Tabla 16.</b> Comparación entre la expresión de PD-L1 de las células tumorales y el tamaño del tumor en las 15 pacientes TILs+, no siendo estadísticamente significativo ( $p = 0.37$ ).....	117
<b>Tabla 17.</b> Análisis comparativo pareado tumor-ganglio del tumor vs. ganglio .....	128
<b>Tabla 18.</b> Análisis comparativo solo en las pacientes TILs- del tumor vs. ganglio.....	129
<b>Tabla 19.</b> Análisis comparativo solo en las pacientes TILs+ del tumor vs. ganglio.....	130
<b>Tabla 20.</b> Genes más expresados en el tumor comparado con el ganglio y su score .....	131
<b>Tabla 21.</b> Análisis comparativo del tumor en pacientes TILs+ vs. TILs- .....	134
<b>Tabla 22.</b> Análisis comparativo del ganglio en pacientes TILs+ vs. TILs-.....	141
<b>Tabla 23.</b> Clasificación de las diferentes firmas génicas que se cubren con los 776 genes del panel nCounter® de Cáncer de Mama 360™ de NanoString .....	159
<b>Tabla 24.</b> Tests de inmunohistoquímica de PD-L1 según los fármacos a los que está asociado, en qué células se valoran y el uso actual que tienen .....	161

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Tasas de incidencia y mortalidad de cáncer mundiales .....	24
<b>Figura 2.</b> Algoritmo para la evaluación del HER2 por IHQ en el tejido invasivo de un espécimen de cáncer de mama .....	28
<b>Figura 3.</b> Algoritmo para la evaluación del HER2 por ISH single probe en el tejido invasivo de un espécimen de cáncer de mama .....	28
<b>Figura 4.</b> Algoritmo para la evaluación de HER2 por ISH dual probe en el tejido invasivo de una muestra de cáncer de mama.....	29
<b>Figura 5.</b> División general de los leucocitos según sus características morfológicas .....	34
<b>Figura 6.</b> Producción de las células inmunes y su posterior diferenciación en los diferentes subtipos.. ..	35
<b>Figura 7.</b> Estructura de un ganglio linfático.....	42
<b>Figura 8.</b> Detalle de un centro germinal teñido con el marcador de activación OX40 (20x) .....	43
<b>Figura 9.</b> Presentación de antígeno a los linfocitos Th (a) y a los linfocitos T citotóxicos (b) .....	44
<b>Figura 10.</b> Las tres fases del immunoediting: eliminación, equilibrio y escape.....	45
<b>Figura 11.</b> Tipos de células inmunes del infiltrado linfocitario tumoral y algunas moléculas secretadas al microambiente tumoral.....	47
<b>Figura 12.</b> Imágenes de tumores ricos y pobres en TILs, y los diferentes tipos de TILs .....	49
<b>Figura 13.</b> Estructuras linfáticas terciarias (TLS) (x10) .....	50
<b>Figura 14.</b> Método estandarizado para la evaluación de los TILs recomendado por el International TILs WorkingGroup.....	52
<b>Figura 15.</b> Relación entre el incremento de expresión génica de seis marcadores inflamatorios con la RCp .....	56
<b>Figura 16.</b> Tasa de RCp del GeparSixto según la presencia de TILs .....	57
<b>Figura 17.</b> Gráfica de Kaplan-Meyer de A) Supervivencia libre de metástasis en pacientes con niveles altos de TILs (> 60%) y niveles bajos ( $\leq$ 60%) en la enfermedad residual después de la neoadyuvancia. B) Supervivencia global en pacientes con niveles altos de TILs (> 60%) y niveles bajos ( $\leq$ 60%) en la enfermedad residual después de la neoadyuvancia .....	58
<b>Figura 18.</b> Gráficas de Kaplan-Meyer para la supervivencia global de 51 pacientes triple negativo estratificadas según el ratio CD8/FoxP3 favorable o desfavorable en A) antes y B) después de la neoadyuvancia.....	59
<b>Figura 19.</b> Gráficas de Kaplan-Meyer para pacientes triple negativo del ensayo clínico BIG 02-98..	61
<b>Figura 20.</b> Comparación del beneficio al trastuzumab en pacientes HER2+ entre pacientes TILs $\geq$ 50% (LPBC) vs. TILs < 50% (non-LPBC).....	62
<b>Figura 21.</b> Supervivencia libre de progresión por A) CD3 > media y B) CD3 $\leq$ media según hayan recibido antraciclinas, CMF (ciclofosfamida + metotrexato + fluoruracilo) o no quimioterapia .....	62



<b>Figura 22.</b> Media y desviación estándar de los porcentajes de CD4, CD8 y CD1a, separados por recurrencia o no en A) ganglios axilares positivos, B) ganglios axilares negativos en una linfadenectomía axilar positiva, y C) ganglios axilares negativos en una linfadenectomía axilar negativa .....	63
<b>Figura 23.</b> Los diferentes receptores de inhibición o estimulación inmune según su expresión el células tumorales, macrófagos, linfocitos T y células dendríticas. ....	65
<b>Figura 24.</b> Esquema de activación e inhibición del linfocito T según la expresión de CD28 o CTLA-4. ....	66
<b>Figura 25.</b> Esquema de activación y desactivación de linfocitos T en el ganglio por las células dendríticas, y en el tumor por las células cancerígenas a través de los marcadores más importantes. ....	70
<b>Figura 26.</b> Esquema con las diferentes pruebas proyectadas en nuestro estudio .....	75
<b>Figura 27.</b> Moléculas utilizadas en la técnica de NanoString. ....	77
<b>Figura 28.</b> Box-plot o diagrama de caja para expresar la diferencia de expresión de CTLA-4 en los linfocitos del ganglio entre las pacientes con alta expresión de TILs (TILs+) y baja expresión (TILs-) .....	108
<b>Figura 29.</b> Box-plot o diagrama de caja para expresar la diferencia de expresión de PD-1 en todo de los linfocitos del ganglio entre las pacientes con alta expresión de TILs (TILs+) y baja expresión (TILs-) .....	108
<b>Figura 30.</b> Box-plot o diagrama de caja para expresar la diferencia de expresión de PD-L1 en el ganglio linfático entre las pacientes con alta expresión de TILs (TILs+) y baja expresión (TILs-) ....	109
<b>Figura 31.</b> Box-plot o diagrama de caja para expresar la diferencia de expresión de PD-L2 en el ganglio linfático entre las pacientes con alta expresión de TILs (TILs+) y baja expresión (TILs-) ....	110
<b>Figura 32.</b> Box-plot o diagrama de caja para expresar la diferencia de expresión de OX-40 en el ganglio linfático entre las pacientes con alta expresión de TILs (TILs+) y baja expresión (TILs-) ....	110
<b>Figura 33.</b> Box-plot o diagrama de caja para expresar la diferencia de expresión de CTLA-4 en el centro germinal (CG) entre las pacientes con alta expresión de TILs (TILs+) y baja expresión (TILs-) .....	111
<b>Figura 34.</b> Box-plot o diagrama de caja para expresar la diferencia de expresión de PD-1 en el centro germinal (CG) entre las pacientes con alta expresión de TILs (TILs+) y baja expresión (TILs-) .....	112
<b>Figura 35.</b> Box-plot o diagrama de caja para expresar la diferencia de expresión de PD-L1 en el centro germinal (CG) entre las pacientes con alta expresión de TILs (TILs+) y baja expresión (TILs-) .....	112
<b>Figura 36.</b> Box-plot o diagrama de caja para expresar la diferencia de expresión de PD-L2 en el centro germinal (CG) entre las pacientes con alta expresión de TILs (TILs+) y baja expresión (TILs-) .....	113
<b>Figura 37.</b> Box-plot o diagrama de caja para expresar la diferencia de expresión de OX-40 en el centro germinal (CG) entre las pacientes con alta expresión de TILs (TILs+) y baja expresión (TILs-) .....	114

<b>Figura 38.</b> Box-plot o diagrama de caja para expresar la diferencia de expresión de PD-L1 en las células tumorales entre las pacientes con alta expresión de TILs (TILs+) y baja expresión (TILs-).	115
<b>Figura 39.</b> Box-plot o diagrama de caja para expresar la diferencia de expresión de OX-40 en las células tumorales entre las pacientes con alta expresión de TILs (TILs+) y baja expresión (TILs-).	115
<b>Figura 40.</b> Heatmap de todas las muestras de tumor (T, en rojo) y ganglio (G, en verde), clasificadas por TILs+ (high en marrón) y TILs- (low, en gris).....	127
<b>Figura 41.</b> Marcadores de activación e inhibición de linfocitos T y sus correspondientes ligandos expresados en las células presentadoras de antígenos .....	132
<b>Figura 42.</b> Heatmap de todas las muestras de tumor, clasificadas por TILs+ (high en marrón) y TILs- (low, en gris) .....	133
<b>Figura 43.</b> Diferencia de expresión génica entre el tumor de las pacientes TILs+ (high) y TILs- (low) por el análisis ANOVA, ordenados por significación estadística.....	139
<b>Figura 44.</b> Heatmap de todas las muestras de ganglio, clasificadas por TILs+ (high en marrón) y TILs- (low, en gris) .....	140
<b>Figura 45.</b> Diferencia de expresión génica entre el ganglio de las pacientes TILs+ (high) y TILs- (low) por el análisis ANOVA, ordenados por significación estadística.....	146
<b>Figura 46.</b> Supervivencia global en el grupo de pacientes PD-L1+ del estudio IMpassion130.....	152
<b>Figura 47.</b> Expresión de RNA del CTLA-4, PD-1, PD-L1 y PD-L2 en pacientes con beneficio claro al ipilimumab, sin beneficio pero con larga supervivencia y sin beneficio.....	158

## INDICE DE FOTOS

<b>Foto 1.</b> Tinción de CTLA-4 en los linfocitos en el área paracortical del ganglio linfático (40x).....	85
<b>Foto 2.</b> Tinción de CTLA-4 del centro germinal del ganglio linfático (20x).....	86
<b>Foto 3.</b> Tinción de CTLA-4 citoplasmático en macrófagos de la medula del ganglio linfático (40x)...	86
<b>Foto 4.</b> Tinción de CTLA-4 granular en el área paracortical (20x).....	87
<b>Foto 5.</b> Tinción de CTLA-4 de las iTILs (40x) .....	87
<b>Foto 6.</b> Tinción de CTLA-4 en los linfocitos de un TLS (40x) .....	88
<b>Foto 7.</b> Tinción de PD-1 en centro germinal y manto (20x) .....	89
<b>Foto 8.</b> Tinción de PD-1 de un ganglio completo, donde se ha señalado el área paracortical (4x) ...	89
<b>Foto 9.</b> Tinción de PD-1 en un folículo primario (20x) .....	90
<b>Foto 10.</b> Tinción de PD-1 en las TILs estromales e intratumorales (20x) .....	90
<b>Foto 11.</b> Tinción de PD-1 de un TLS dentro del área tumoral en una paciente TILs+ (10x) .....	91
<b>Foto 12.</b> Tinción de PD-1 intensa de las TILs concentrada en una zona concreta a los lados de un nido tumoral (10x) .....	91
<b>Foto 13.</b> Tinción de PD-L1 del seno subcapsular de un ganglio linfático (10x). .....	92
<b>Foto 14.</b> Tinción de PD-L1 en los macrófagos de un centro germinal (40x).....	93
<b>Foto 15.</b> Tinción de PD-L1 en el folículo primario (izquierda, entre los dos centros germinales) y en el área paracortical (10x). .....	93
<b>Foto 16.</b> Detalle de la tinción de PD-L1 de células dendríticas en el área paracortical (20x) .....	94
<b>Foto 17.</b> Tinción de PD-L1 en los macrófagos de los senos medulares del ganglio linfático (10x)....	94
<b>Foto 18.</b> Tinción de PD-L1 en las células tumorales (20x) .....	95
<b>Foto 19.</b> Tinción de PD-L1 en las TILs, especialmente las estromales adyacentes al tumor (10x) ...	95
<b>Foto 20.</b> Tinción de PD-L1 en el tumor (tinción de membrana) y en los TILs intratumorales (tinción puntiforme) (40x).....	96
<b>Foto 21.</b> Tinción de PD-L1 en macrófagos (40x). Se distinguen de las células tumorales al no formar estructuras tan compactas como un nido (izquierda abajo), y su citoplasma tiene un color distinto. .	96
<b>Foto 22.</b> Tinción de PD-L1 en un TLS (20x) .....	97
<b>Foto 23:</b> Tinción de PD-L2 en un centro germinal (40x).....	98
<b>Foto 24.</b> Tinción de PD-L2 en la zona paracortical, posiblemente en las células dendríticas (40x)...	98
<b>Foto 25.</b> Tinción de PD-L2 en los macrófagos de los senos medulares y médula (20x) .....	99
<b>Foto 26.</b> Tinción de PD-L2 en células tumorales de una paciente TILs+ (20x) .....	99
<b>Foto 27.</b> Tinción de PD-L2 en un TLS (20x) .....	100
<b>Foto 28.</b> Tinción de PD-L2 en las TILs estromales (20x) .....	100
<b>Foto 29.</b> Tinción de OX-40 del centro germinal y borde capsular (10x).....	101
<b>Foto 30.</b> Detalle del centro germinal, donde se aprecia que el OX-40 no tiñe los macrófagos (60x). .....	102
<b>Foto 31.</b> Tinción de OX-40 de un folículo primario (centro arriba) y un folículo secundario con centro germinal (izquierda abajo) (10x).....	102

<b>Foto 32.</b> Tinción de OX-40 difusa de células dendríticas y linfocitos de la zona paracortical (40x) .	103
<b>Foto 33.</b> Tinción de OX-40 citoplasmática intensa de macrófagos y linfocitos en senos medulares y linfocitos de la médula (40x).....	103
<b>Foto 34.</b> Tinción de OX-40 intensa en todo el ganglio de una paciente TILs- (4x) .....	104
<b>Foto 35.</b> Tinción de OX-40 de membrana en las células tumorales (40x).....	104
<b>Foto 36.</b> Tinción de OX-40 citoplasmática en células tumorales (20x).....	105
<b>Foto 37.</b> Tinción de OX-40 en TILs estromales y prácticamente nulo en las células tumorales (20x) .....	105
<b>Foto 38.</b> Tinción de OX-40 de una estructura linfática terciaria dentro del área tumoral (10x). .....	106
<b>Foto 39.</b> Tinción de OX-40 en las TILs adyacentes al tumor (podrían ser T reguladoras) (4x).....	106
<b>Foto 40.</b> Detalle tinción de OX-40 en las TILs del borde de un nido tumoral (20x).....	107
<b>Foto 41.</b> Tinción de OX-40 de un centro germinal irregular en una paciente TILs+ (10x).....	117
<b>Foto 42.</b> Tinción de PD-1 en los TLS dentro del área tumoral de una paciente TILs+ (4x) .....	118
<b>Foto 43.</b> Detalle de tinción del área paracortical y centro germinal por CTLA-4, OX-40, PD-1, PD-L1, PD-L2 y CD8, en el ganglio de una paciente TILs- (20x).....	119
<b>Foto 44.</b> Detalle de tinción del área paracortical y un centro germinal por CTLA-4, OX-40, PD-1, PD-L1, PD-L2 y CD8, en el ganglio de una paciente TILs+ (20x).....	120
<b>Foto 45.</b> Tinción de PD-L1 y OX-40 en el tumor de una paciente TILs+ con células tumorales PD-L1+ (20x) .....	121
<b>Foto 46.</b> Tinción de PD-L1 y OX-40 en el tumor de una paciente TILs- con células tumorales OX-40 muy positivo (20x).....	121
<b>Foto 47.</b> Tumor de una paciente TILs+ teñido de PD-L1, CD8 y OX-40. A) zona interna (10x); B) detalle TILs estromales (20x) .....	123
<b>Foto 48.</b> Tinción en el tumor de una paciente TILs+ con células tumorales PD-L2+ por CTLA-4, OX-40, PD-1, PD-L1, PD-L2 y CD8 (20x).....	124
<b>Foto 49.</b> Detalle de tinción un TLS interno (izquierda) por CTLA-4, OX-40, PD-1, PD-L1, PD-L2 y CD8, en el tumor de una paciente TILs+ (10x).....	125



## RESUMEN

El cáncer de mama triple negativo es el subtipo que actualmente tiene el peor pronóstico de todos los cánceres de mama. Son un 15% de todos ellos, suelen aparecer en pacientes jóvenes y su progresión es tan rápida que un 70% fallece en los cinco primeros años. En los últimos años se ha visto que el sistema inmune juega un papel esencial en el control de los tumores, especialmente en aquellos agresivos y con un componente genético importante como es el cáncer de mama triple negativo. Mediante diferentes estudios, se ha demostrado que la presencia de linfocitos dentro del tumor al diagnóstico mejora notablemente el pronóstico de estas pacientes.

Con este proyecto, queremos entender las causas porqué unas pacientes tienen esta infiltración inmune mientras que otras no. Si entendemos bien el origen que explique estas diferencias, podríamos aplicar tratamientos para inducir que las células inmunitarias vayan al tumor y ejerzan allí su función de vigilantes de la integridad del cuerpo humano. La hipótesis principal es que las células inmunitarias se han quedado retenidas en los ganglios linfáticos regionales a través de unos receptores o “frenos” inmunitarios.

Para testar la hipótesis, se identificaron quince pacientes que tenían mucha infiltración de células inmunes y veinte que no tenían apenas ninguna. Se realizaron pruebas de inmunohistoquímica para reconocer cinco biomarcadores (los frenos inmunitarios) en el ganglio, y se ha podido probar que el CTLA-4 (del inglés *Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4*) está más expresado en el ganglio de pacientes con poca infiltración en el tumor ( $p=0.01$ ). Si en el futuro se administrara un anticuerpo anti-CTLA-4, podríamos testar si podemos desactivar el freno que retiene a los linfocitos. De esta manera podríamos favorecer la infiltración de linfocitos en el tumor y así poder eliminarlo.

*Triple Negative Breast Cancer is the tumor subtype that currently has the worst prognosis of all breast malignancies. This subtype represents 15% of all breast cancer, commonly appearing in young women, and progressing so rapidly that 70% of patients succumb within 5 years of diagnosis. In the last few years, it has been established that the immune system plays a key role in tumor control, especially among these most aggressive tumors demonstrating the triple negative component. Different studies have demonstrated that the presence of lymphocytes in the tumor at diagnosis significantly improves the prognosis of these patients.*

*With this project, we would like to understand why some patients have this lymphocyte infiltration while others lack it. If we can explain the source of this difference, we might apply immunotherapeutic tools to induce immune cells to migrate into the tumor to perform their protective function. The main hypothesis is that immune cells are retained in regional lymph nodes via receptors acting as immune “brakes”.*

*To test this hypothesis, we identified fifteen patients with high immune cell infiltration and twenty with very low infiltration. We tested five antibodies with immunohistochemistry to identify biomarkers (the immune “brakes”) within their lymph nodes and we discovered that CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4) is more expressed in the lymph nodes among patients with very low immune infiltration within their tumors ( $p=0.01$ ). In the future, we could administer an anti-CTLA-4 antibody to test whether we are able to deactivate the brake that restrains lymphocyte infiltration. If so, we could enable lymphocyte infiltration into the tumor bed with the aim of eliminating it.*

## ABREVIATURAS

AJCC: <i>American Joint Committee on Cancer</i>	LAG3: <i>Lymphocyte-activation gene 3</i>
ASCO: <i>American Society of Medical Oncology</i>	LFD: linfadenectomía
ARN: ácido ribonucleico	TILs: <i>Tumor Infiltrating Lymphocytes</i>
CAP: <i>College of American Pathologists</i>	TLS: <i>Tertiary lymphoid structures</i>
CD: <i>Cluster of Differentiation</i>	TGF- $\beta$ : <i>Transforming growth factor- <math>\beta</math></i>
CDx: <i>Companion Diagnostic Test</i>	VEGF: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
CG: Centro Germinal	MDSC: <i>Myeloid-derived Suppressor Cells</i>
CM: Cáncer de mama	MHC: <i>Major Histocompatibility Complex</i>
CMTN: Cáncer de Mama Triple Negativo	OSNA: <i>One Step Nucleic Acid Amplification</i>
CPA: Células presentadoras de antígenos	pMMR: <i>del inglés proficient Mismatch Repair</i>
CTLA-4: <i>Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4</i>	PCR: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
CTL: <i>Citolytic T Lymphocyte</i>	PD-1: <i>Programmed Death 1</i>
CXCR3: Receptor 3 de quimiocina alfa (CXC)	PD-L1: <i>Programmed Death-Ligand 1</i>
DAMPs: <i>Damage-associated molecular patterns</i>	PD-L2: <i>Programmed Death-Ligand 2</i>
dMMR: <i>deficient Mismatch Repair</i>	QT: Quimioterapia
FAS: <i>First apoptosis signal</i>	RCp: Respuesta Completa patológica
FDR: <i>false discovery rate</i>	RE: Receptor de estrógeno
FISH: <i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>	RH: Receptores hormonales
FoxP3: <i>Forkhead box P3</i>	RP: Receptor de progesterona
GC: ganglio centinela	RPKM: <i>reads per kilobase per million</i>
GA: ganglio axilar no centinela	SI: Sistema Inmunológico
GITR: <i>Glucocorticoid-Induced TNFR-related</i>	SAM: <i>Significance Analysis of Microarrays</i>
HER2: <i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>	TAMs: <i>Tumor Associated Macrophages</i>
HR: <i>hazard ratio</i>	TCGA: <i>The Cancer Genome Atlas</i>
ICOS: <i>Inducible T-cell costimulator</i>	TCR: <i>T cell Receptor</i>
IDO: <i>Indoleamine 2,3 dioxygenase</i>	TIGIT: <i>T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains</i>
Igs: inmunoglobulinas	TILs: <i>Tumor Infiltrating Lymphocytes</i>
IHQ: Inmunohistoquímica	TMB: <i>Tumor mutational burden</i>
IL: Interleucina	TIM3: <i>T cell immunoglobulin and mucin domain containing 3</i>
MSI: <i>microsatellite instability</i>	Tfh: Linfocitos T foliculares
INF- $\gamma$ : Interferón $\gamma$	Th: <i>T helper</i> o linfocito T colaborador
ISH: <i>In Situ Hybridization</i>	TLR: <i>Toll-Like Receptor</i>
IT: Inmunoterapia	TNF- $\alpha$ : <i>Tumor Necrosis Factor <math>\alpha</math></i>

# INTRODUCCIÓN

---

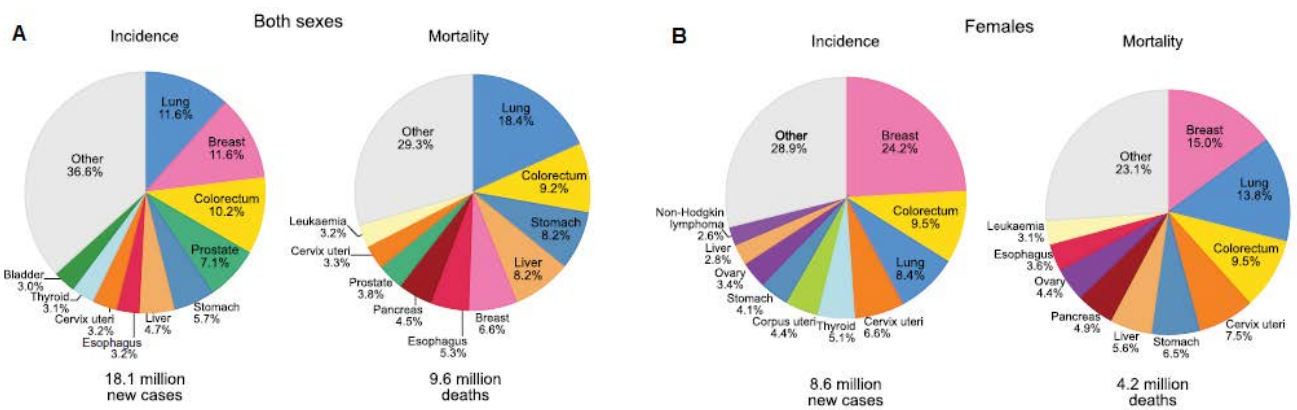


# INTRODUCCIÓN

## 1. Cáncer de mama

El cáncer de mama (CM) es el tumor maligno más frecuente en mujeres, la primera causa de muerte por cáncer en mujeres, y la quinta causa de muerte por cáncer en el mundo después del cáncer de pulmón, colorrectal, estómago e hígado<sup>1</sup>. En 2018 se diagnosticaron 2,088,849 nuevos casos de CM de los 18,078,957 casos de cáncer totales (11.6%), y se registraron 626,679 muertes mundiales por CM de las 9,555,027 muertes por cáncer (6.6%)<sup>1</sup> (Figura 1). En algunos países del mundo (especialmente en África) hay más incidencia y mortalidad por cáncer de cérvix que de mama<sup>1</sup>.

Hay diferencias entre regiones ricas y pobres en la incidencia (54.4% vs. 31.3%) y mortalidad (11.6% vs. 14.9%) del CM<sup>1</sup>. Esto se debe principalmente a la implementación de los programas de cribado y al acceso a fármacos, además de un menor número de hospitales y médicos por habitante. La incidencia ha ido en aumento en los países en vías de desarrollo muy probablemente debido al aumento de distintos factores de riesgo conocidos, entre los que se pueden señalar el incremento de la obesidad, la disminución de la actividad física y los cambios en los hábitos reproductivos<sup>1</sup>.



**Figura 1.** Tasas de incidencia y mortalidad de cáncer mundiales. A) En ambos sexos; B) En mujeres. Fuente: Imagen tomada de Globocan 2018<sup>1</sup>.

### 1.1. Características

El CM es un tumor que aparece en las glándulas mamarias, sobre todo en mujeres (< 1% de los cánceres de mama es en hombres<sup>2</sup>). Los dos tipos de carcinomas invasivos más frecuentes se definen según el lugar de aparición en la mama:

- a) Carcinoma de mama tipo no especial (clásicamente conocido como carcinoma ductal infiltrante): se forma en los conductos galactóforos, que es por donde circula la leche desde las glándulas al pezón. Representa el 80% de todos los tumores de mama.
- b) Carcinoma lobulillar infiltrante: se produce en los lobulillos mamarios, que es donde se produce la leche. Representa el 10% de todos los tumores.

El resto de tumores (10%) son menos habituales y presentan características histopatológicas propias (ej. mucinoso, micropapilar y el tubular, entre otros).

Aparte del tipo de tumor, para diagnosticar y tratar correctamente el cáncer de mama, se han de conocer otros aspectos como son el estadiaje tumoral o el grado histológico, entre otros. Aunque hay distintas maneras de valorar el grado histológico, uno de los métodos más utilizados es el de Nottingham, en el que se comparan las células cancerígenas con las células normales<sup>3</sup>:

- a) Grado I: las células cancerígenas se parecen bastante a las unidades del conducto lobular, formación de túbulos (>75%), grado medio de pleomorfismo nuclear y bajo recuento mitótico.
- b) Grado II: tienen un parecido moderado con las normales.
- c) Grado III: no se parecen a las normales, tienen un marcado grado de pleomorfismo celular, no hay apenas formación de túbulos (<10%) y frecuentes mitosis.

Los tumores pueden ser unicéntricos (un tumor), multifocales (dos o más tumores en un único cuadrante) o multicéntricos (dos o más tumores en cuadrantes distintos). Dependiendo del tamaño tumoral (se considera el más grande si hay más de un tumor), se clasifican en T1 (T1a: 1-5 mm, T1b: 6-10 mm o T1c: 11-20 mm), T2 (>20 mm y ≤ 50 mm), T3 (> 50 mm) y T4 (T4a: invasión torácica, T4b: cutánea, T4c: ambos o T4d: inflamatorio).

Además del estudio del tumor primario, con posterioridad se hace una investigación de extensión de la invasión linfática (ganglios) y hemática (otros órganos) para saber si la enfermedad se ha extendido. Según el número de ganglios locorreionales invadidos, se clasifican:

- NX: ganglios linfáticos regionales no evaluables
- N0: sin evidencia de metástasis ganglionares
- N1: metástasis en adenopatías móviles en nivel I, II axilar ipsilateral
- N2: metástasis en adenopatías fijas en nivel I, II axilar ipsilateral o adenopatías en mamaria interna ipsilateral en ausencia de adenopatías a nivel axilar
  - N2a: metástasis en adenopatías axilares ipsilaterales en nivel I, II fijas
  - N2b: metástasis en adenopatías en mamaria interna ipsilateral en ausencia de adenopatías a nivel axilar

- N3: metástasis a nivel infraclavicular ipsilateral (nivel III axilar) con o sin afectación axilar a nivel I, II; o adenopatías en mamaria interna ipsilateral con adenopatías a nivel I, II axilar; o metástasis a nivel supraclavicular ipsilateral con o sin afectación axilar o de mamaria interna.
  - N3a: metástasis en adenopatías infraclaviculares ipsilaterales
  - N3b: metástasis en mamaria interna ipsilateral con afectación axilar
  - N3c: metástasis en adenopatías supraclaviculares ipsilaterales

La diseminación por otras partes del cuerpo se clasifica en M0 (no hay metástasis) o M1 (hay metástasis en uno o más órganos).

Cuando se tiene el tamaño, el número de ganglios afectados y la presencia o no de metástasis se hace el TNM, que es la base para la estadificación internacional en base a la *American Joint Committee on Cancer* (AJCC)<sup>4</sup> (Tabla 1).

**Tabla 1.** Estadios del cáncer de mama según el TNM en base a AJCC<sup>4</sup>.

<b>Estadio I</b>	IA	T1-T1N0M0
	IB	T0-T1NmicM0
<b>Estadio II</b>	IIA	T0N1**M0, T1N1**M0 o T2N0M0
	IIB	T2N1M0 o T3N0M0
<b>Estadio III</b>	IIIA	T0-T3N2M0 o T3N1M0
	IIIB	T4N0-N2M0
	IIIC	T0-T4N3M0
<b>Estadio IV</b>	IV	T0-T4N0-N3M1 (cáncer metastásico)

\*T1 incluye T1mic; \*\*Tumores T0 y T1 con micrometástasis únicamente se excluyen del estadio IIA y se clasifican como estadio IB

## 1.2. Subtipos basados en histopatología

Hay cuatro biomarcadores usados en el estudio anatomopatológico del CM para el diagnóstico del subtipo de cáncer de la paciente y que además determinarán el abordaje terapéutico. Son los receptores de estrógenos (RE) y progesterona (RP) (receptores hormonales), el HER2 (del inglés, *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*) y el Ki67 (factor de tasa de crecimiento). Con estos biomarcadores y, haciendo una aproximación a la definición genómica de los tumores definidos por Perou *et al.*<sup>5</sup>, se definen cuatro subtipos de CM por inmunohistoquímica (IHQ) (Tabla 2).

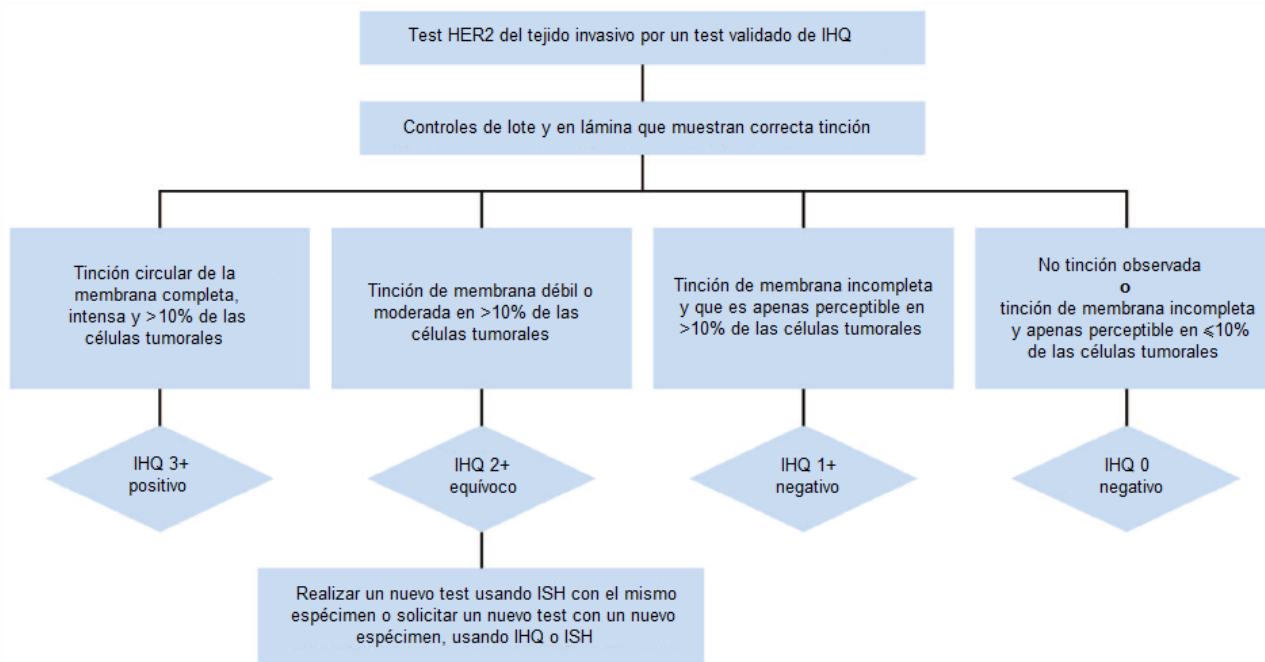
**Tabla 2.** Clasificación del cáncer de mama según biomarcadores histopatológicos<sup>6</sup>.

<b>LUMINAL A</b> <b>Hormonal no agresivo</b>	RE y RP+, HER2– Ki67 < 20% (crecimiento lento)	
<b>LUMINAL B/HER2-</b> <b>Hormonal agresivo HER2-</b>	RE+ HER2–	Ki67 ≥ 20% (crecimiento rápido) o RP– / < 20%
<b>LUMINAL B/HER2+</b> <b>Hormonal agresivo HER2+</b>	RE+ HER2+	Cualquier Ki67 Cualquier expresión de RP
<b>HER2+</b>	RE y RP– HER2+	
<b>TRIPLE NEGATIVO</b>	RE y RP– HER2–	

RE: receptores de estrógenos; RP: receptores de progesterona; HER2: *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*; Ki67: factor de tasa de crecimiento

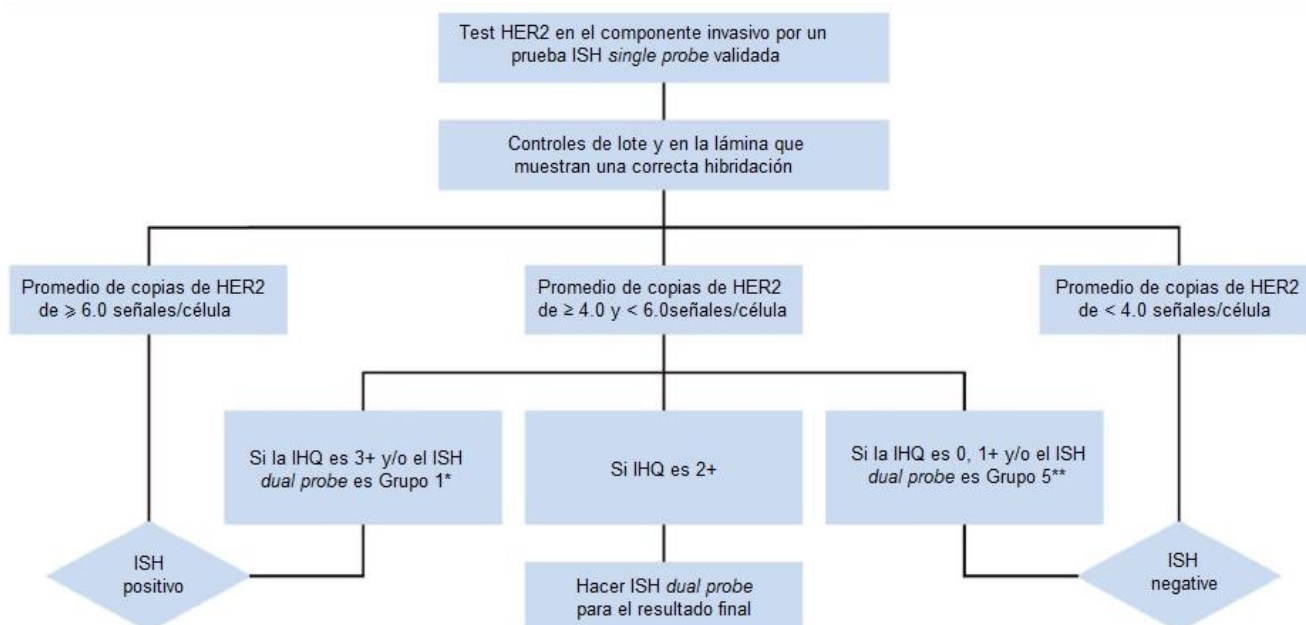
La positividad de los marcadores viene definida según las guías de consenso de ASCO/CAP (del inglés *American Society of Medical Oncology/College of American Pathologists*). El RE y el RP se valoran por IHQ del 0 al 100%, dependiendo del porcentaje de células que lo expresan y se consideran positivos cuando son ≥ 1%<sup>7</sup>. Estas recomendaciones son las publicadas en 2010 y corresponden a la reunión de las dos sociedades en 2008.

En 2018 salieron unas nuevas guías del marcador HER2, donde actualizaron especialmente como tratar los casos equívocos<sup>8</sup>. Este receptor se ha de valorar primero por IHQ del 0 al 3+, siendo 0 y 1+ negativo, 2+ equívoco y 3+ positivo (Figura 2). Cuando sale 2+ (equívoco), se procede a hacer o bien la técnica ISH (*In Situ Hybridization*) *single probe* (Figura 3) para medir el número de copias del gen *HER2* por célula y en comparación con otro gen de referencia (CEP17), o bien la técnica ISH *single probe* (Figura 4), que solo mide el número de copias de HER2 por célula. Por ISH *single probe*, se considera amplificado si tiene un promedio de ≥ 6,0 copias de HER2/célula; no amplificado cuando tiene un promedio de < 4,0 copias de HER2/célula; y equívoco cuando el promedio de copias de HER2 por células es ≥ 4,0 y < 6,0. Cuando es equívoco, se debería realizar la técnica del ISH *dual probe*. Por ISH *dual probe*, se dice que el HER2 está amplificado si el ratio entre los dos genes es ≥ 2,0 y ≥ 4,0 copias/célula; no amplificado cuando el ratio es < 2,0 con un promedio de < 4,0 copias de HER2/célula; y equívoco ocurre en estos tres casos: ratio ≥ 2,0 y < 4,0 copias/célula, ratio < 2,0 y ≥ 6,0 copias/célula y ratio < 2,0 y un promedio de ≥ 4,0 y < 6,0 copias/célula. En cada caso equívoco hay que proceder según unos algoritmos diferentes (no mostrados), y que básicamente consiste en hacer IHQ en secciones del mismo bloque que se usó para el ISH *dual probe* y en caso equívoco, repetir la valoración del ISH por un segundo patólogo.



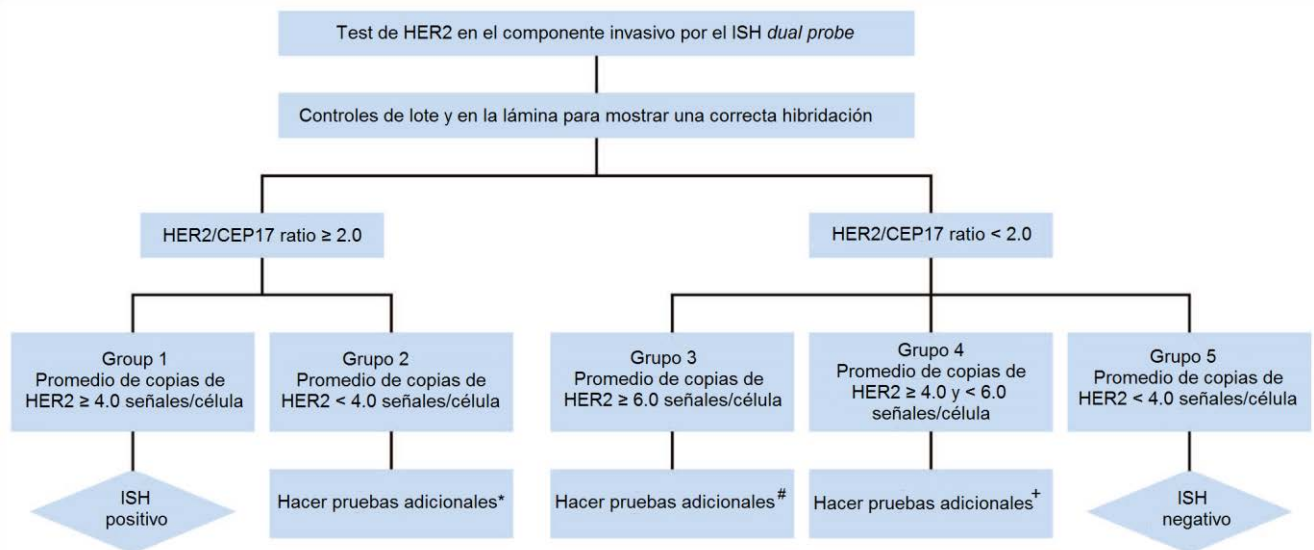
**Figura 2.** Algoritmo para la evaluación del HER2 por IHQ en el tejido invasivo de un espécimen de cáncer de mama. Cualquier caso que salga fuera de las categorías definidas se trata como equivoco.

Fuente: imagen adaptada de Wolf et al.<sup>8</sup>. HER2: *human epidermal growth factor receptor 2*; IHQ: inmunohistoquímica; ISH: *in situ hybridization*.



**Figura 3.** Algoritmo para la evaluación del HER2 por ISH *single probe* en el tejido invasivo de un espécimen de cáncer de mama. En cualquier caso que salga fuera de las categorías definidas se debería tratar como equivoco. El Grupo 1\* y Grupo 5\*\* vienen definidos en la Figura 4

Fuente: imagen adaptada de Wolf et al.<sup>8</sup>. HER2: *human epidermal growth factor receptor 2*; IHQ: inmunohistoquímica; ISH: *in situ hybridization*.



**Figura 4.** Algoritmo para la evaluación de HER2 por ISH *dual probe* en el tejido invasivo de una muestra de cáncer de mama. El Grupo 1\*, Grupo 2# y Grupo 3+, habría que hacer pruebas adicionales y seguir otro esquema de decisión publicados en el artículo (no se muestra).

Fuente: imagen adaptada de Wolf *et al.*<sup>8</sup>. HER2: *human epidermal growth factor receptor 2*; IHQ: inmunohistoquímica; ISH: *in situ hybridization*.

### 1.3. Subtipos basados en perfiles de expresión génica

En los últimos años han ido apareciendo chips –más conocidos por su palabra en inglés *microarrays*– y paneles de genes como PAM50 de la tecnología NanoString, gracias a los cuales se han precisado más los diferentes subtipos de CM<sup>9,10</sup>. Sin embargo, otros tests, como el Oncotype DX<sup>11,12</sup> o MammaPrint<sup>13</sup>, sí que se han implementado en la decisión sobre la aplicación o no de QT adyuvantes en pacientes RH+ en estadios iniciales de la enfermedad.

Un análisis más exhaustivo de 587 pacientes triples negativos llevó a Lehmann *et al.*<sup>14</sup>, en 2011, a diferenciar el CMTN en seis tipos con unos patrones intrínsecos genéticos muy característicos: basal 1, basal 2, inmunomodulatorio, mesenquimal, mesenquimal *stem-like* y receptor de andrógeno luminal. Un análisis posterior, realizado por Burstein *et al.*<sup>15</sup>, clasificó los tumores de mama triple negativos en cuatro subtipos: basal inmunosuprimidos, basal inmunoactivados, mesenquimales y receptores de andrógeno luminal. La Tabla 3 resume las dos clasificaciones y cómo se solaparían.

**Tabla 3.** Subtipos de cáncer de mama según el análisis de sus perfiles de expresión génica.

<b>Subtipos según Lehmann <i>et al.</i> (2011)</b>	<b>Subtipos según Burstein <i>et al.</i> (2015)</b>
Basal 1 Basal 2	Basal inmunosuprimido
Inmunomodulatorio	Basal inmunoactivado
Mesenquimal Mesenquimal <i>stem-like</i>	Mesenquimal
Receptor de andrógeno luminal	Receptor de andrógeno luminal

Clasificación según Lehmann<sup>14</sup> y Burstein<sup>15</sup>.

Esta clasificación de CMTN podría constituir una base para la optimización de los diferentes tratamientos disponibles (véase que incluso podrían recibir hormonoterapia aquellas del subgrupo receptor de andrógeno luminal), identificar aquellas pacientes con mejor pronóstico (el subtipo inmunomodulatorio tiene el mejor pronóstico, y el basal inmunosuprimido, el peor) o mejorar el diseño de los ensayos clínicos futuros.

#### **1.4. Oportunidad para la inmunoterapia**

El tratamiento de CM depende de numerosos factores, entre los que se incluye la clasificación por IHQ. No es el objetivo de este trabajo de tesis doctoral profundizar en el tratamiento del CM. La Tabla 4 tan sólo pretende dejar reflejadas unas pinceladas que, como tales, no permiten al lector más que hacerse una idea superficial de éstos.

**Tabla 4.** Tipos de tratamientos aprobados para pacientes de cáncer de mama según su subtipo<sup>6</sup>

<b>LUMINAL A</b> <b>Hormonal no agresivo</b>	Hormonoterapia Terapia dirigida	Quimioterapia Antiangiogénicos*
<b>LUMINAL B / HER2-</b> <b>Hormonal agresivo</b>		
<b>LUMINAL B / HER2+</b> <b>Hormonal agresivo</b>	Hormonoterapia Terapia dirigida Anti-HER2	
<b>HER2+/RH-</b>	Terapia dirigida Anti-HER2	
<b>TRIPLE NEGATIVO</b>		

\* Los antiangiogénicos como el bevacizumab sólo están aprobados en el contexto metastásico en algunos países; HER2: *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*; RH: receptores hormonales.

El subgrupo de CM que actualmente menos opciones de tratamiento tiene es el triple negativo. Al no tener ningún biomarcador identificado en la práctica clínica, no tiene ninguna terapia específica, y solo se puede hacer QT estándar. Por tanto, se trata de un tumor con necesidades médicas no cubiertas, ya no solo por la carencia de tratamientos dirigidos, sino porque sus opciones terapéuticas tienen unas toxicidades importantes. Por esta razón, y por otras que veremos más adelante, es en este tipo de pacientes donde más se está testando la inmunoterapia (IT), sola o en combinación, y tanto en líneas metastásicas como en neoadyuvancia, con resultados ya muy prometedores.

### 1.5. Cáncer de mama triple negativo

El CMTN comprende alrededor del 15% (rango 10-20%) del CM<sup>16</sup>. Es el subtipo de peor pronóstico, ya que tienen una menor supervivencia global (SG) y supervivencia libre de progresión (SLP). El 70% de las pacientes triple negativo fallecen en los cinco primeros años del diagnóstico en comparación con el 44% de los otros cánceres<sup>17</sup>. Hay una rápida progresión desde la recaída hasta el fallecimiento (9 vs. 20 meses de media de supervivencia desde la recurrencia<sup>18</sup>). Todo esto es debido a varias razones:

- a) Son tumores más agresivos, de crecimiento muy rápido. Sólo el 32,8% se diagnostican en estadio I en comparación con el 45,7% de los otros tumores<sup>17</sup>.
- b) Aparecen en pacientes más jóvenes (< 50 años), y hay mayor porcentaje de pacientes de menos de 40 años (12,2 vs. 5,7% en otros tumores)<sup>17</sup>.



- c) Normalmente se detectan por autopalpación y no por mamografía, ya que en la mayoría de países ésta se hace de manera rutinaria a partir de los 50 años.
- d) Hay un mayor porcentaje de pacientes de origen africano (10,0 vs. 4,4%) e hispano (18,6 vs. 12,8%)<sup>17</sup>.
- e) Dos tercios de los tumores son > 2 cm en el diagnóstico, cuando en los otros subtipos son un tercio de ellos<sup>18</sup>.
- f) Tienen un porcentaje mayor de pacientes con los ganglios afectados, y no siguen una correlación con el tamaño del tumor. En los otros tumores sí que hay una correlación, donde el 19% de las mujeres con tumores < 1 cm tienen nódulos positivos comparado con el > 90% de las mujeres con tumores > 5 cm<sup>18</sup>.
- g) La mayoría son tumores ductales infiltrantes y de grado III (66 vs. 28%)<sup>18</sup>.
- h) En un mayor porcentaje de los casos se asocian a mutaciones en BRCA1/2 y p53.
- i) Tienen una alta carga mutacional.
- j) Tienen una probabilidad más alta de metástasis a distancia, sobre todo viscerales (pulmón, cerebro e hígado).
- k) Poseen una mayor probabilidad de recaída. El tiempo medio de recaída es de 2,6 años en comparación con cinco años para otros cánceres<sup>18</sup>. Sin embargo, a partir de los ocho años desde el diagnóstico apenas se observan recaídas, cuando en los otros tipos de cánceres el riesgo de recurrencia es más constante<sup>18</sup>.

## 2. Vigilancia inmunológica para el control de los tumores

El sistema inmunológico (SI) es el encargado de salvaguardar la integridad de los órganos del cuerpo humano y defenderlo de cualquier agente extraño o de cualquier proteína que sea reconocida como perjudicial. Está formado por un conjunto de tejidos (médula ósea, bazo, timo, ganglios y conductos linfáticos), de células inmunológicas y de proteínas liberadas por estas (inmunoglobulinas [Igs], interleucinas [IL], complemento, etc.). Hay dos tipos de respuestas inmunes que se diferencian por el momento de actuación, las células que participan y la especificidad de la respuesta:

- Respuesta innata: es aquella que actúa de manera inmediata ante el reconocimiento de antígenos extraños al organismo. Reconoce patrones generales y no es específica ante el tipo de agente que la causa, pero es muy efectiva para poner un primer freno rápido y alertar y dirigir a otras células inmunes hacia el lugar de la invasión. No genera memoria inmunológica. Está formado por células fagocíticas y por el sistema del complemento.

- **Respuesta adaptativa:** es específica ante el tipo de antígeno en cuestión y por tanto, muy efectiva para acabar con la “invasión”. Además, genera memoria inmunológica que garantiza una respuesta adaptativa mejor y más rápida para apariciones similares posteriores. Hay dos tipos, la respuesta inmunitaria celular, mediada por los linfocitos T, y la respuesta inmunitaria humoral, mediada por los linfocitos B y con secreción de anticuerpos (Igs). La respuesta celular está pensada para microorganismos intracelulares (virus y algunas bacterias) y células cancerígenas, y la respuesta inmunitaria humoral para invasiones de microorganismos externos y toxinas. En cáncer se ha estudiado más la función de la respuesta celular, pero también hay una respuesta humoral cuyo conocimiento es menor.

Hay seis características principales del SI adaptativo que definen su funcionamiento: la especificidad, la diversidad, la memoria, la especialización, la autolimitación y la no-autorreactividad<sup>19</sup>, cuya definición se resume en la Tabla 5:

**Tabla 5.** Características de la respuesta inmune adaptativa<sup>19</sup>

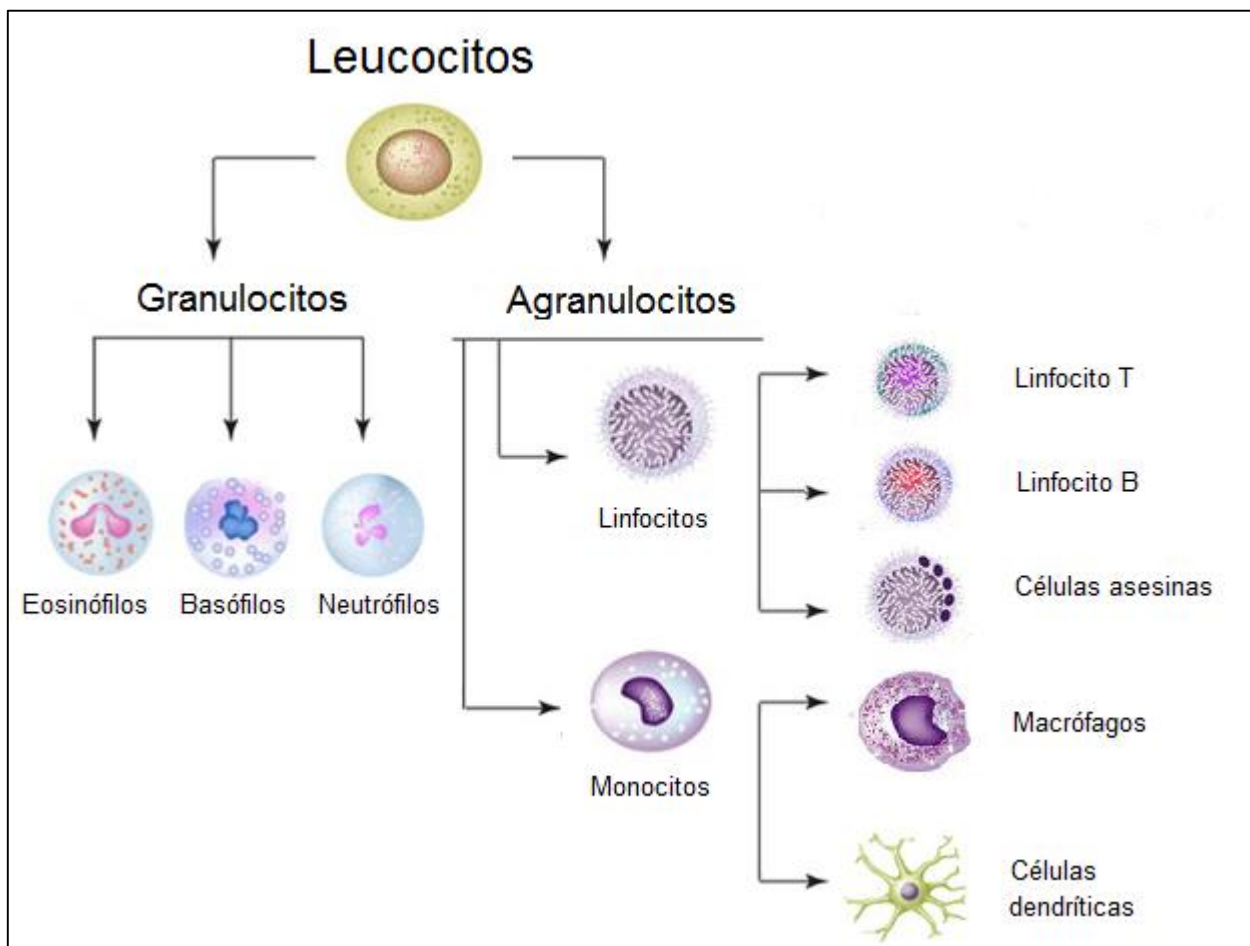
<b>Característica</b>	<b>Significancia</b>
Especificidad	La respuesta inmune es única para cada antígeno reconocido e incluso para cada región o epítipo del antígeno
Diversidad	El sistema inmune es capaz de reconocer una gran variedad de antígenos diferentes, que viene reflejado en el repertorio linfocítico de cada organismo
Especialización	Responde de manera distintiva y específica ante diferentes antígenos
Memoria	Después de una primera exposición al antígeno, el sistema inmune se activa para que en la segunda o sucesivas exposiciones la respuesta sea más rápida, más grande y efectiva que la primera
Autolimitación	El sistema inmune es capaz de volver a su estado basal (homeostasis) cuando el “peligro” ha sido erradicado
No-autorreactividad	Es capaz de diferenciar a los organismos intrusos de las células propias, y no dañarlas cuando las células inmunes actúan sobre el invasor

De estas seis propiedades, la que probablemente más relevancia tiene en cáncer es la no-autorreactividad. Esta condición no solo es característica de la respuesta adaptativa, sino que es también común a la respuesta innata. Todas las células del SI deben ser capaces de diferenciar aquellas células que son propias del organismo de las que no lo son. Es lo que se llama tolerancia inmunológica. Si no, se destruirían los tejidos, como ocurre en las enfermedades autoinmunes. En el caso de las células cancerígenas, éstas son células propias del organismo que se han vuelto aberrantes porque han tenido uno o varios cambios (mutaciones, sobreexpresión de genes, etc.) que han hecho que la célula crezca y se divida sin control. Al ser una célula con muchas características

similares a la normal, es más difícil detectarla que a una bacteria, por ejemplo. Cuando el SI no ha podido reconocer a las primeras células cancerosas o dar una respuesta adecuada a su aparición, seguirán creciendo y se formará un tumor macroscópico.

## 2.1. Tipos de células inmunológicas

Las células del SI se llaman leucocitos o glóbulos blancos, y son las encargadas de reconocer y destruir cualquier elemento extraño al organismo. Los leucocitos se dividen en granulocitos y agranulocitos, según el número de gránulos en el citoplasma. Los granulocitos tienen muchos gránulos y derivan de la célula madre mieloide. Son los neutrófilos, basófilos/mastocitos y eosinófilos, según se tiñan o no con colorantes básicos o ácidos. Los agranulocitos son los linfocitos (T, B y células asesinas [NK, del inglés *Natural Killer*]) y los monocitos (macrófagos y células dendríticas) (Figura 5).

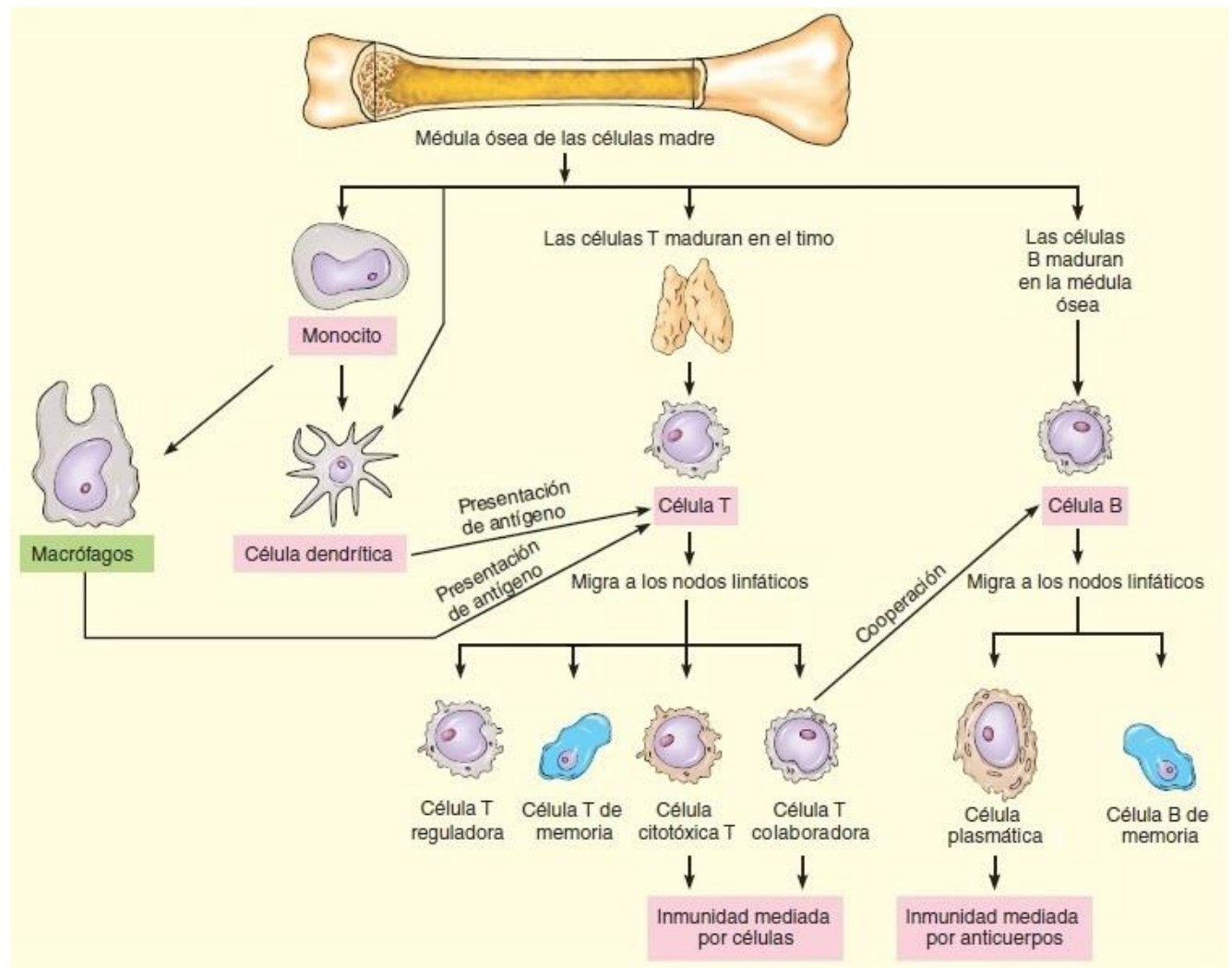


**Figura 5.** División general de los leucocitos según sus características morfológicas. Los granulocitos tienen muchos gránulos con enzimas en el citoplasma y el núcleo lobulillado. Los agranulocitos no tienen gránulos y el núcleo es redondo y de gran tamaño, ocupando casi todo el citoplasma<sup>20</sup>.

Desde el punto de vista funcional, los glóbulos blancos se dividen según actúen en la respuesta innata/inespecífica, en la adaptativa/específica o en la interrelación de ambas:

- Células de la respuesta innata: células fagocíticas (macrófagos y neutrófilos) y las células asesinas o NK.
- Células de la respuesta adaptativa: linfocitos B y linfocitos T.
- Células presentadoras de antígenos: células dendríticas y macrófagos.

La interrelación entre la respuesta innata y adaptativa se hace a través de las células presentadoras de antígenos (CPA), que son principalmente las células dendríticas y en menor medida los macrófagos, que captan antígenos liberados al exterior para presentárselos a los linfocitos T. Los linfocitos B se activan gracias a los linfocitos T ayudantes (Th, del inglés *T helper*) (Figura 6).



**Figura 6.** Producción de las células inmunes y su posterior diferenciación en los diferentes subtipos. Fuente: adaptado de B. Solomon *et al.*<sup>21</sup>.

### 2.1.1. Linfocitos T

Los linfocitos T son las células inmunes de la respuesta adaptativa celular. Hay varios tipos de linfocitos, que se diferencian según sus funciones, y que por tanto expresan diferentes marcadores: linfocitos T efectoras, citotóxicos o citolíticos (CTL, del inglés *Cytolytic T Lymphocyte*), Th, T reguladores y T de memoria (Figura 6).

Los linfocitos T progenitores se generan en la médula ósea a partir de la célula madre, y a través de la sangre van a madurar al timo para convertirse en linfocitos T. Allí se seleccionan solo aquellos que no reaccionen contra antígenos propios del organismo (autoantígenos). Después de esta selección y maduración, son liberados a la circulación desactivados para la búsqueda constante de antígenos extraños. Una vez que han localizado un antígeno, los linfocitos se mueven hacia los ganglios linfáticos para su diferenciación y su posterior activación (Figura 6).

Solo reconocen antígenos unidos al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, del inglés *Major Histocompatibility Complex*). A esto se le conoce como restricción del MHC, ya que este receptor solo se expresa en células propias del organismo. Maduran en el timo y se caracterizan por ser CD3+. Solo reconocen antígenos péptidos, no otro tipo de biomoléculas como los linfocitos B, que pueden descubrir cadenas glucídicas.

#### 2.1.1.1. Linfocitos T citotóxicos

Los linfocitos T citotóxicos son los encargados de destruir células que producen proteínas extrañas en el citoplasma (inmunidad celular). Son CD8+ y solo reconocen antígenos presentados por el MHC clase I expresado en la célula diana y las CPA. Son las células efectoras por excelencia para la destrucción de las células tumorales, y son muy importantes en la autoinmunidad<sup>20</sup>.

Cuando se produce la sinapsis entre los receptores, el linfocito T citotóxico tiene tres mecanismos para eliminar la célula diana. El primero es a través de la secreción de las citocinas interferón  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) y factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , del inglés, *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* ) para desencadenar su apoptosis<sup>22</sup>. El segundo sería la liberación de las proteínas citotóxicas (granzima A, B y C, y perforinas). Las perforinas crean poros en la membrana celular para que las granzimas puedan entrar y bloqueen la síntesis de proteínas virales y así conducir a la apoptosis celular. Este sistema se hace de manera unidireccional a través de unas uniones llamadas sinapsis inmunitarias<sup>23</sup>. El tercer mecanismo es a través de la interacción de Fas (del inglés, *First Apoptosis Signal*). Las células CD8+ activadas expresarían Fas para que a través de la unión de su ligando (FasL) expresado en la célula diana provoquen una cascada de señalización. Esta cascada activaría las caspasas para

inducir la apoptosis celular<sup>23</sup>. Cabe destacar que las células CD8+ también pueden expresar tanto Fas como FasL. Esto ocurre en las fases finales del proceso inmunológico, ya que se pueden destruir entre sí durante el proceso llamado fratricidio haciendo que todas desaparezcan<sup>20</sup>.

### 2.1.1.2. Linfocitos T colaboradores

Los Th reconocen antígenos presentados por los fagocitos y los estimulan a través de citocinas para que los destruyan desde el interior. También se encargan de activar a los linfocitos B y T. Son CD4+ y solo reconocen proteínas extracelulares presentadas por el MHC clase II. Además de los linfocitos T reguladores, de los que se hablará más extensamente en el siguiente apartado, hay dos tipos principales de Th: los Th1 y los Th2<sup>20</sup>. Otros linfocitos Th cuya función es más desconocida en cáncer son los Th17 y los T foliculares.

Los Th1 secretan principalmente IFN- $\gamma$ , lo que favorece su diferenciación e inhibe a los Th2 y la IL-12. La diferenciación de los linfocitos Th1 se produce en respuesta a antígenos que han presentado las células asesinas y los macrófagos. Los Th1 devuelven a los macrófagos la señal de eliminar a los antígenos fagocitados. El IFN- $\gamma$  estimula la síntesis de IgGs por los linfocitos B para opsonizar a las células diana y así favorecer su fagocitosis. Se considera que crean un ambiente proinflamatorio<sup>20</sup>.

Los Th2 secretan principalmente IL-5 e IL-6, que favorecen su diferenciación y activación. También secretan la IL-10 segregada por ellos mismos y por otras células, que favorece la inhibición de los Th1. Cuando los Th2 están activados, se considera que favorece un ambiente antiinflamatorio<sup>20</sup>.

Al principio de una respuesta inmunitaria suele haber subpoblaciones heterogéneas de síntesis de citocinas, pero en las infecciones crónicas predomina una u otra ya que se autoestimulan y tienen una inhibición cruzada.

Los Th17 y los linfocitos T ayudantes foliculares (Tfh, del inglés *Follicular helper T cells*) se encuentran en menor presencia pero son también muy importantes para la regulación de la respuesta inmune. Los Th17 secretan la IL-17 y, en menor medida, la IL-22. Su principal función es la inducción de reacciones inflamatorias como los Th1, especialmente las que son ricas en neutrófilos. Los Tfh tienen una función muy importante en la activación de linfocitos B dentro de los centros germinales ganglionares. Se caracterizan por expresar CXCR5, PD-1 (del inglés, *Programmed Death 1*), IL-21 e ICOS (del inglés, *Inducible T-cell costimulator*)<sup>20</sup>.

### **2.1.1.3. Linfocitos T reguladores**

Los linfocitos T reguladores son los encargados de reducir la respuesta inmune cuando el peligro ha sido erradicado y para limitar daños al tejido sano. Son CD4+CD25+FoxP3+ (del inglés, *Forkhead box P3*), y secretan la IL-10. El FoxP3 marcador es el encargado de realizar las funciones de regulación de estas células. Su principal efecto es la supresión de la activación, proliferación y producción de citocinas por parte de los linfocitos T citotóxicos y colaboradores.

*A priori*, se asocia negativamente la presencia de linfocitos T reguladores dentro de un tumor, ya que se interpreta que ha silenciado la respuesta inmune cuando aún no ha acabado su labor. Se suele usar mucho el ratio CD8/FoxP3 para evaluar si el tumor se encuentra en un medio activo o inactivo inmunológicamente.

### **2.1.2. Linfocitos B**

Los linfocitos B son las células principales de la inmunidad humoral. Secretan anticuerpos (Igs) para opsonizar organismos extraños para que otras células puedan fagocitarlos. Al igual que los linfocitos T, derivan de una célula madre linfoide, pero estas maduran en la misma médula ósea y migran a los ganglios linfáticos para su posterior diferenciación en células plasmáticas o en linfocitos B de memoria (Figura 6).

Las células plasmáticas son los linfocitos B maduros (que son capaces de secretar anticuerpos) y se caracterizan por ser CD20+, mientras que los linfocitos B inmaduros son CD19+. Expresan el MHC clase II. A diferencia de los linfocitos T, reconocen antígenos en su forma original, no necesitan que sean procesados por otras células. Las células plasmáticas mueren a los pocos días de su activación, pero los anticuerpos que producen duran más de tiempo.

Después de una primera exposición al antígeno, se generan linfocitos B de memoria, que harán que en las exposiciones subsecuentes haya una respuesta inmunológica más rápida y más específica. Los antígenos proteicos que presentan los linfocitos Th generan mucha más memoria que los antígenos polisacáridos. Los linfocitos B de memoria pueden vivir varios años, y generarán con rapidez células plasmáticas si se vuelven a encontrar con el mismo antígeno (respuesta inmune secundaria).

Los linfocitos B reguladores están considerados también un tercer subtipo de linfocito B. Su función es presentar el antígeno a los linfocitos Th para la activación de la respuesta humoral. También se ha visto que estas células secretan IL-10, que inhibe la producción de otras citocinas proinflamatorias: IL-2, INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . De esta manera, consiguen inhibir las respuestas Th1.

En general, no se conoce muy bien el papel de los linfocitos B en cáncer, si su presencia en el infiltrado tumoral es proinflamatoria o antiinflamatoria, y hasta qué punto los antígenos tumorales son capaces de generar linfocitos B de memoria.

### **2.1.3. Células dendríticas**

Las células dendríticas son las CPA por excelencia, ya que son capaces de capturar, procesar y presentar antígenos a los linfocitos T citotóxicos y Th, y generar respuestas inmunes específicas. También son células de la respuesta innata, ya que pueden fagocitar células cancerígenas. Normalmente expresan el MHC clase II y tienen una cantidad de estos complejos muy superior a los linfocitos B o macrófagos. Además, son capaces de presentar antígenos tanto a linfocitos T activados como “vírgenes”. Por ambas razones, se dice que son las CPA más potentes.

Las células dendríticas inmaduras se caracterizan por el marcador CD1a y su función es más bien fagocítica. Cuando residen en un tejido, su superficie celular suele ser muy grande para poder captar la presencia de patógenos o células infectadas. Por otro lado, las células dendríticas maduras se caracterizan por ser CD83+ y su función es la de presentar los antígenos a los linfocitos T en el ganglio linfático, por lo que también suelen tener una gran superficie celular para poder contactar con un mayor número de linfocitos<sup>24</sup>.

Son muy importantes para la tolerancia inmunológica, ya que participan en la selección de linfocitos T en el timo (tolerancia central). Dado que puede que algunos linfocitos T escapen a este proceso de tolerancia, y porque además hay antígenos propios que no están presentes en el timo o que surgen más tarde en la vida del individuo, las células dendríticas también restringen los linfocitos T circulantes autorreactivos (tolerancia periférica).

Hay otro subtipo de células dendríticas, las células dendríticas foliculares que no derivan de la médula ósea. Son células estromales que derivan de las células mesenquimales en los tejidos conectivos. No expresan MHC clase II. Forman parte de los centros germinales de los ganglios linfáticos y captan antígenos que están unidos a un anticuerpo o al complemento para presentárselos a los linfocitos B. Guardan relación con los antígenos presentados por las células dendríticas a los Th en la zona T del ganglio<sup>24</sup>.



#### 2.1.4. Macrófagos

Los macrófagos son los encargados de fagocitar células extrañas y hacer la presentación de sus antígenos a los linfocitos T en los ganglios linfáticos para su posterior selección y activación. Son CD68+ y expresan en la superficie altos niveles de MHC clase I. Cuando están dentro del microambiente tumoral se les llama *Tumor Associated Macrophages* o TAMs, y se dividen en dos grupos según su función: M1 y M2.

Los macrófagos M1 son antitumorales y se activan a través del reconocimiento de patrones moleculares asociados al daño celular (DAMPs, del inglés *Damage-associated molecular patterns*) y de la secreción de la IL-12 y el INF- $\gamma$ . Los M1 fagocitan a las células tumorales y presentan los antígenos tumorales a los linfocitos T. También secretan al medio TNF- $\alpha$  y óxido nítrico<sup>19</sup>

Los macrófagos M2 son protumorales y se activan a través de la IL-4 e IL-13. Secretan IL-4, IL-5 e IL-10, entre otras moléculas, y promueven la angiogénesis tumoral.

Los M2 se pueden diferenciar de toda la población de macrófagos CD68+ usando el marcador CD163. Los M1 no parecen tener ningún marcador característico.

#### 2.1.5. Células asesinas

Las células asesinas o NK son las células de la inmunidad innata más relacionadas con una respuesta antitumoral, ya que han demostrado la capacidad de erradicar tumores<sup>25</sup>. Se caracterizan por ser CD3-CD16+CD56+.

Las células NK ejercen su función a través de dos mecanismos:

- a) Citotoxicidad natural: es un proceso espontáneo por el cual las NK reconocen de forma innata alteraciones de una célula cancerígena y liberan sus gránulos citotóxicos así como perforinas para que puedan penetrar en la célula.
- b) Citotoxicidad mediada por anticuerpos: son capaces de identificar una célula recubierta de anticuerpos y ejercer su actividad citotóxica.

Las NK también son capaces de liberar citocinas como el TNF- $\alpha$  o el IFN- $\gamma$  para la activación y proliferación de células inmunitarias.

### 2.1.6. Células mieloides supresoras

Las células mieloides supresoras (MDSC, del inglés *myeloid-derived suppressor cell*) son un grupo mixto de células de origen mielóide que proliferan en situaciones de inflamación crónica como en el cáncer, ya que la producción hematopoyética queda perturbada por señales del tumor. En una situación normal, las células mieloides derivarían a células dendríticas, macrófagos y neutrófilos<sup>25</sup>.

Tienen funciones inmunosupresoras, especialmente sobre los linfocitos T citotóxicos, y también promueven la angiogénesis y la proliferación del tumor a través de la liberación de citocinas como el TGF- $\beta$  (del inglés, *Transforming growth factor- $\beta$* ). Son CD11b+.

## 2.2. Antígenos tumorales

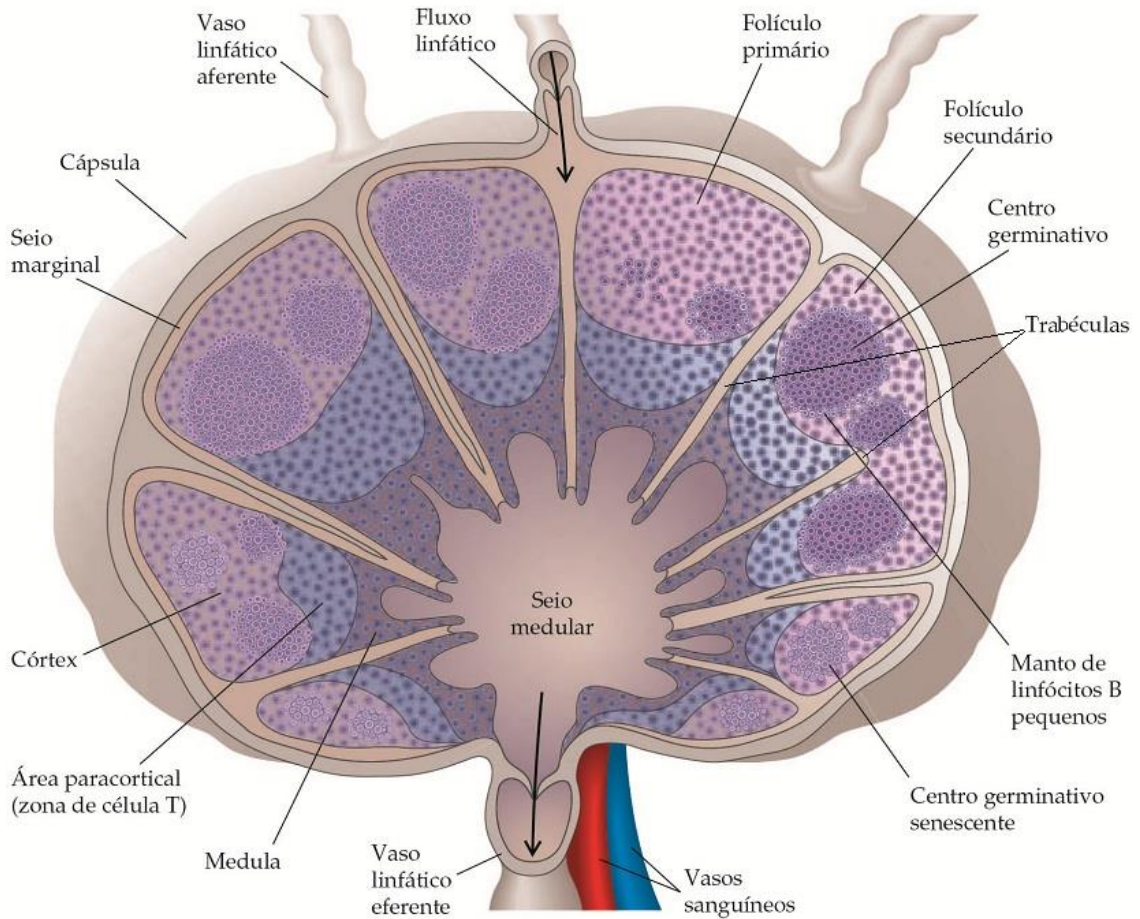
Los antígenos tumorales son aquellas moléculas que se expresan en los tumores de manera diferente a las células normales. Se pueden clasificar en dos tipos:

- a) Antígenos específicos del tumor o neoantígenos: son antígenos que solo se expresan en los tumores y no en una célula normal. Ejemplos de estos serían una proteína aberrante procedente de un gen mutado o proteínas que se expresan en la etapa embrionaria pero no en la etapa adulta, como el antígeno carcinoembrionario.
- b) Antígenos asociados a tumores: se expresan tanto en células normales como en tumores, pero en las tumorales lo hacen de manera aberrante, excesiva o con una regulación diferente.

El SI debería ser capaz de detectar estos antígenos e ir al lugar de origen para destruir las células cancerígenas antes de que se descontrole su crecimiento y se forme el tumor macroscópico.

## 2.3. Estructura de los ganglios linfáticos

Los ganglios linfáticos son unas estructuras ovaladas comunicadas entre sí por los vasos linfáticos, a través de los cuales circula la linfa. Tienen un tamaño de aproximadamente 1 cm y están distribuidos por todo el cuerpo, pero son más numerosos en el cuello, axila, abdomen e ingles. Se pueden distinguir cuatro partes principales del ganglio: la cápsula, la corteza o córtex, área paracortical o paracórtex y la médula (Figura 7).



**Figura 7.** Estructura de un ganglio linfático.

Fuente: imagen tomada David JR *et al.*<sup>26</sup>.

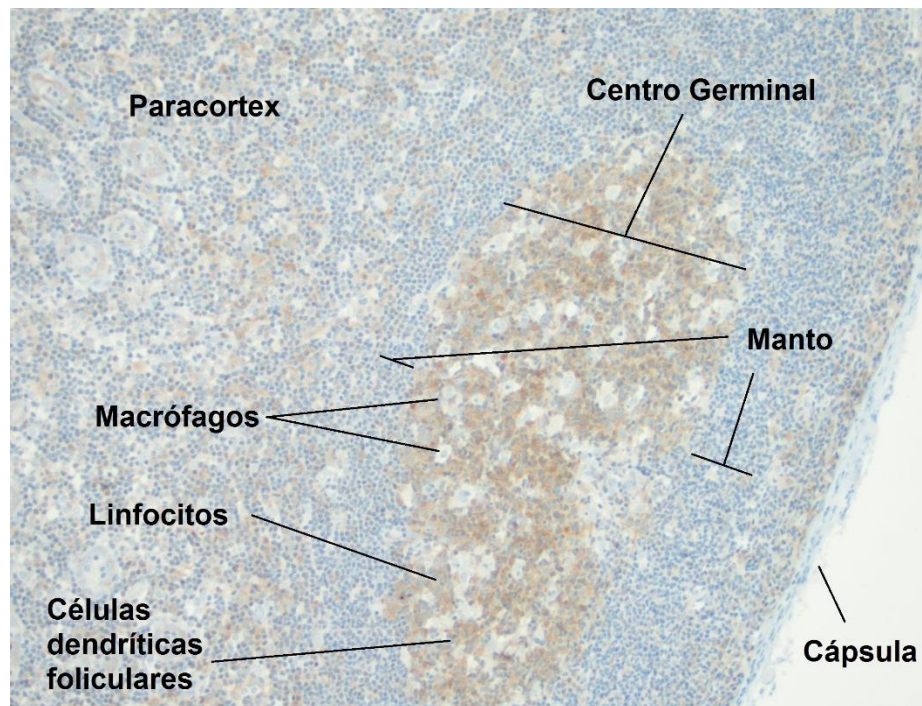
La cápsula es una capa de tejido conectivo de colágeno que rodea al ganglio, y que se hunde hacia dentro formando trabéculas, que ayudan a mantener la estructura y a compartimentalizar el ganglio. El exterior de la cápsula está perforado por los vasos linfáticos aferentes, que es por donde entra la linfa. Ésta se filtra a través del seno marginal, pasa por la corteza y la trabécula hasta llegar al seno medular, y ahí sale por los vasos eferentes, que se encuentran en la zona de la hendidura. A ellos también llegan vasos sanguíneos, que se dividen en capilares para entrar por las trabéculas<sup>26</sup>.

La corteza está formada por folículos, que si no tienen centros germinales se llaman primarios, y si los tienen se les llama secundarios. Los folículos primarios están formados por linfocitos B maduros en reposo que no han sido estimulados por ningún antígeno. Los centros germinales de los folículos secundarios son estructuras redondeadas que aparecen cuando los linfocitos B han sido estimulados por la presentación de un antígeno extraño (Figura 8). Alrededor del centro germinal aparece el manto, que está formado por linfocitos B inactivos. El centro germinal está formado, además de por

linfocitos B, por células dendríticas foliculares, macrófagos y, en menor número, por centrocitos, centroblastos y células reticulares. Los Tfh son los encargados de hacer la presentación de antígeno a los linfocitos B. Los macrófagos presentes fagocitan aquellos linfocitos que no son reactivos al antígeno, y son los que dan al CG un aspecto de “cielo estrellado”. Los centrocitos tienen citoplasma abundante y un núcleo grande e indentado con la cromatina laxa. Los centroblastos son más grandes que los centrocitos, el citoplasma es basófilo y el núcleo redondo, con gránulos y con varios nucléolos<sup>27</sup>.

El área paracortical es la zona del ganglio compuesta principalmente por linfocitos Th (~70%), y por los T citotóxicos y muchas células dendríticas interdigitales y macrófagos, que hacen la presentación de antígeno. Sin embargo, esta proporción cambia si hay infección vírica, donde se produce un considerable aumento de los linfocitos T citotóxicos. Las células dendríticas pueden tener una superficie muy extensa para poder presentar muchos antígenos diferentes. Al microscopio se ven rápidamente debido a su abundante citoplasma, claro y con límites no muy bien definidos, que contrasta con la escasez de citoplasma de los linfocitos T. En la paracórtex también se pueden observar pequeños capilares o vénulas que es por donde circula la sangre dentro del ganglio<sup>27</sup>.

La médula es la zona central y más cercana a la hendidura del ganglio, está compuesta por cordones medulares que rodean a los senos medulares formada por células plasmáticas, macrófagos y células dendríticas.

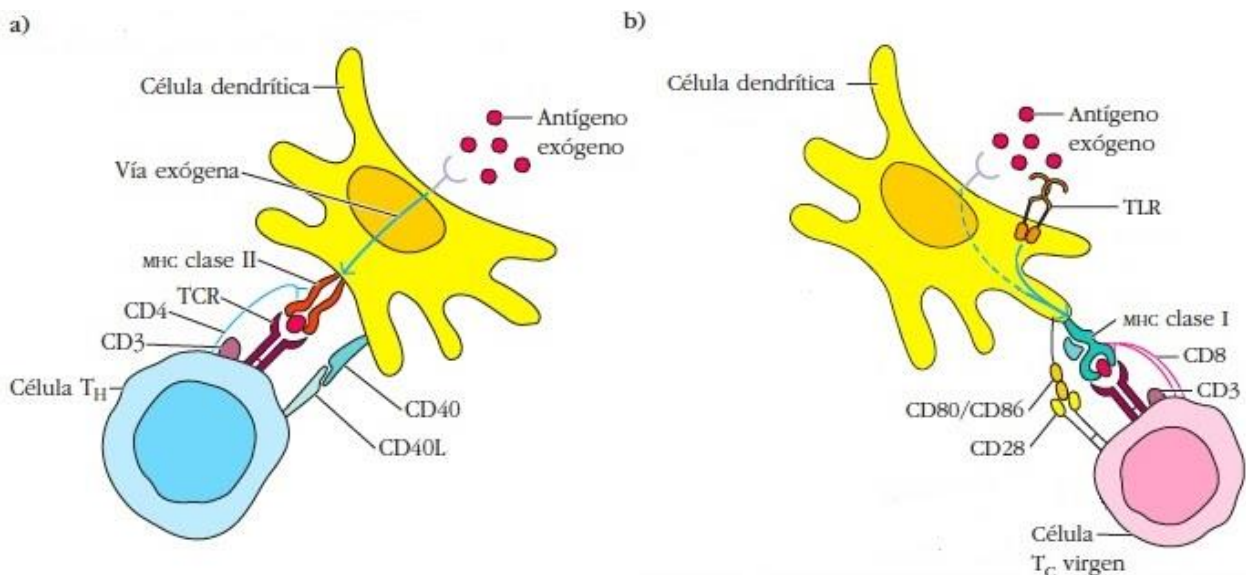


**Figura 8.** Detalle de un centro germinal teñido con el marcador de activación OX40 (20x).

## 2.4. Presentación de antígenos y reconocimiento inmunológico

La presentación de antígenos es el primer paso que ocurre para desencadenar una respuesta inmunitaria específica frente al tumor. Los antígenos tumorales son detectados a través de varias vías: 1) liberación espontánea al torrente sanguíneo de restos de células muertas; 2) presentación directa de la célula tumoral a las células inmunes, y 3) presentación de antígenos por las CPA que han fagocitado una célula tumoral o sus restos<sup>20</sup>.

Como hemos comentado anteriormente, las células efectoras más importantes en cáncer son los linfocitos T citotóxicos. Estos se pueden encontrar viajando en el torrente sanguíneo como linfocitos T vírgenes o residiendo en los ganglios linfáticos (Figura 7). Cuando se encuentran con un antígeno liberado en la sangre, los linfocitos se mueven hacia los ganglios linfáticos para su activación y proliferación. Una vez activados vuelven al torrente sanguíneo para ir al lugar de la estimulación antigénica. Aquellos que se encuentran ya en los ganglios linfáticos esperan la recepción de la activación antigénica a través de las CPA o de las propias células tumorales. Los linfocitos reactivos contra el antígeno se activarán y se especializarán en linfocitos T citotóxicos o Th principalmente (Figura 9). También tiene lugar una activación de los linfocitos B, donde se genera un centro germinal en los folículos primarios a partir de los linfocitos B activados, y se especializan en células plasmáticas (productoras de Igs) y en linfocitos B de memoria (Figura 9). Por tanto, un ganglio con un área paracortical extensa o con muchos centros germinales implica que es un ganglio activo cuyas células han reconocido la presencia de un agente extraño (en nuestro caso un tumor)<sup>19</sup>.

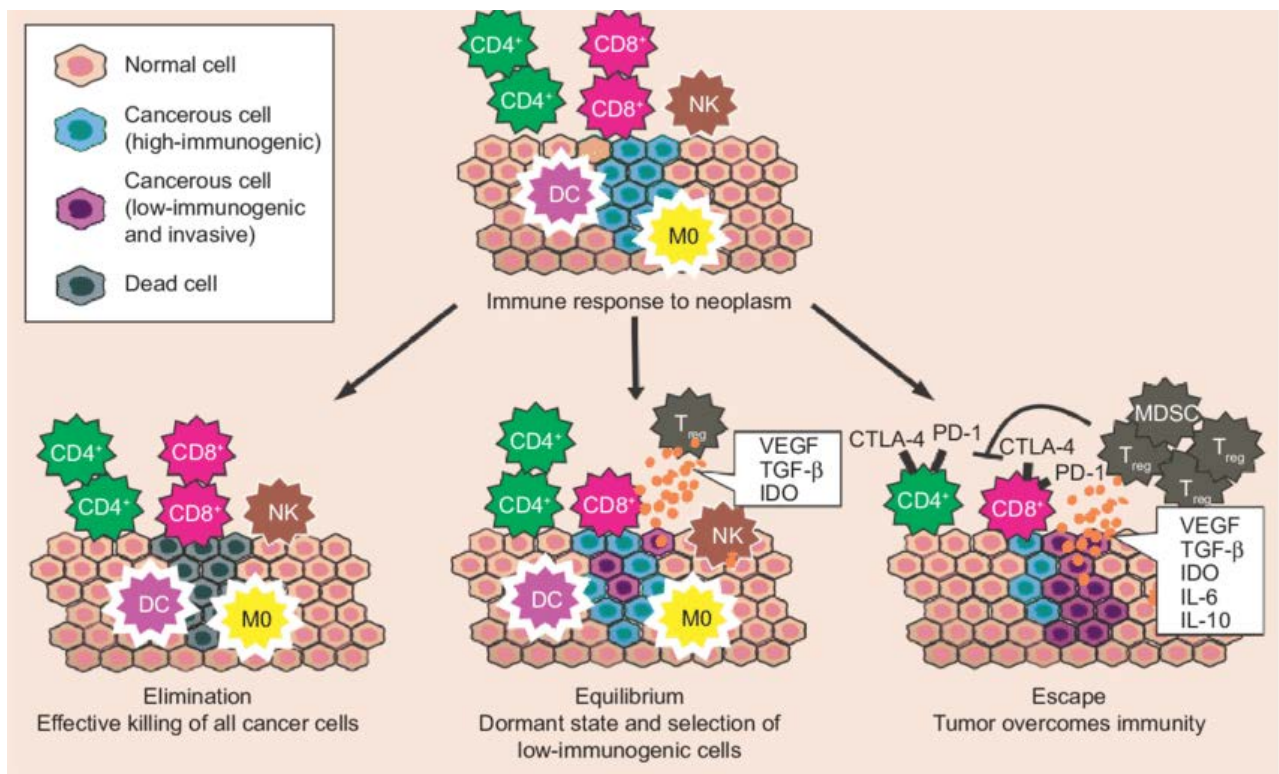


**Figura 9.** Presentación de antígeno a los linfocitos Th (a) y a los linfocitos T citotóxicos (b). MHC: *Major Histocompatibility Complex*; Th: *T helper*; TCR: *T cell receptor*; CD: *Cluster of Differentiation*; TLR: *Toll-Like Receptor*; Tc: *Linfocito T citotóxico*.

Fuente: adaptado de Owen *et al.*<sup>27</sup>

## 2.5. Supresión inmunológica y desarrollo del tumor

Se ha acuñado el término inglés *immunoediting* para designar a todos los procesos de comunicación que hay entre el tumor y las células inmunitarias dentro del microambiente tumoral. Se han identificado tres fases del *immunoediting* (llamadas las 3 E's) y son eliminación, equilibrio y escape (Figura 10). En la fase de eliminación, las células inmunes han reconocido a las primeras células cancerígenas como extrañas y han ido al lugar del tumor en un intento por destruirlo. Esto se conoce también como vigilancia inmunológica (en inglés, *immune surveillance*). En la segunda fase, uno o varios clones lograrían sobrevivir al ataque de las células inmunitarias, y habría entonces un equilibrio entre la velocidad de crecimiento del tumor y la eliminación de las células cancerígenas. Esta variante o variantes que han sobrevivido son más resistentes al ataque inmunológico (posiblemente menos inmunogénicas). Se cree que la fase de equilibrio puede durar años. En la última fase, de escape, el tumor, a través de varios mecanismos (secreción de citocinas inhibitorias, activación de células reguladoras, expresión de *immune checkpoints*, etc.) consigue desactivar el SI por completo y seguir creciendo<sup>28,29</sup>.



**Figura 10.** Las tres fases del *immunoediting*: eliminación, equilibrio y escape.

Tipos de células: CD4+: linfocito T ayudante; CD8+: linfocito T citotóxico; Treg: linfocito T regulador, NK: célula asesina; M0: macrófago; DC: célula dendrítica; MDSC: célula mieloide supresora. Ir al listado de abreviaturas para el significado de cada gen o de las abreviaturas.

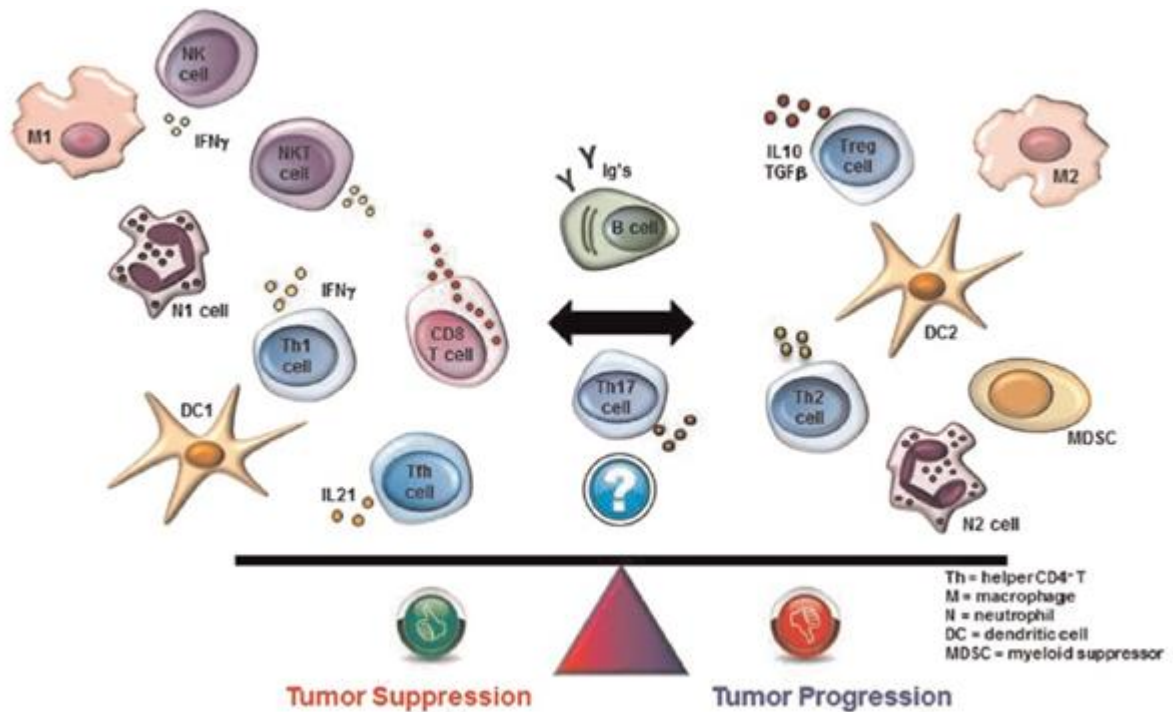
Fuente: Imagen tomada de Andrade de Mello *et al.*<sup>30</sup>

### 3. Linfocitos infiltrantes del tumor en cáncer de mama

Los linfocitos infiltrantes del tumor (o *Tumor Infiltrating Lymphocytes* (TILs), del inglés) son el conjunto de células del SI que se encuentran dentro del área tumoral. El CM no ha sido considerado uno de los más inmunogénicos –comparado con otros como el melanoma o cáncer renal, por poner tan solo dos ejemplos. Aun así, la presencia o no de TILs y sus diferentes poblaciones se han estudiado en numerosos ensayos clínicos adyuvantes y neoadyuvantes para valorar el beneficio de ciertas terapias y su valor pronóstico. En la actualidad se siguen haciendo muchos esfuerzos en el ámbito internacional para intentar comprender mejor su función y composición, y se está investigando la presencia de los diferentes marcadores de activación o supresión inmunológica (*immune checkpoints*) y su expresión en los diferentes tipos celulares. Además, se han hecho unas guías internacionales, promovidas por el *International Immuno-Oncology WorkingGroup*<sup>31</sup>, para intentar estandarizar su evaluación. Actualmente estas guías no suelen formar parte de la práctica clínica habitual, ya que la presencia de TILs aún no conlleva ninguna decisión clínica. Sin embargo, hay patólogos que han empezado a mencionar la presencia o no de la infiltración linfocitaria a título informativo en sus informes.

#### 3.1. Poblaciones de linfocitos presentes en el área tumoral

Los TILs están formados principalmente por linfocitos T (en especial, los citotóxicos CD8+) y Th<sup>32</sup>, aunque también se han identificado poblaciones de linfocitos B, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos y NK. Hay tipos de células cuya presencia suprime el crecimiento del tumor, otros tipos celulares que se asocian más a la progresión del tumor, debido a que favorecen la desactivación del SI, y otras células cuya función aún no está clara (como por ejemplo, los linfocitos B). Además, un mismo tipo celular, como los linfocitos T ayudantes (Th) se pueden orientar hacia una respuesta Th1 (supresión del tumor) o hacia una respuesta Th2 (progresión). En la Figura 11 se ilustran las células del SI presentes en el tumor, algunas de las moléculas que secretan al medio, y si favorecen o no la supresión del tumor.



**Figura 11.** Tipos de células inmunes del infiltrado linfocitario tumoral y algunas moléculas secretadas al microambiente tumoral.

Th: *T helper*; M: macrófago; N: neutrófilo; DC: *Dendritic Cell* o célula dendrítica; MDSC: *Myeloid-derived supresor cell* o célula mioide supresora; B cell: linfocito B; NK: *Natural Killer* o célula asesina; T cell: linfocito T; Treg: linfocito T regulador; Igs: inmunoglobulinas; IFN- $\gamma$ : interferon  $\gamma$ ; IL: interleucina; TGF- $\beta$ : *transforming growth factor*  $\beta$ .

Fuente: tomado de Hendry *et al.*<sup>33</sup>.

Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> son las principales células efectoras para destruir el tumor. Su localización es importante, habiendo células en contacto directo con las células tumorales (intratumorales) y otras entre los nichos (estroma) o en la periferia. Ya que los linfocitos citotóxicos tienen que estar en contacto con la célula cancerígena para su destrucción, si el estroma es muy fibroso (con mucho colágeno), podría limitar su infiltración<sup>34</sup>. Dentro del CM suelen ser más abundantes en los tumores HER2 y triple negativo, ya que son los que tienen mayor inestabilidad genómica y por tanto suelen generar más antígenos tumorales que son reconocidos por estos<sup>35</sup> (Tabla 6).

**Tabla 6.** Porcentaje de infiltración por linfocitos CD8<sup>+</sup> en cada subtipo de cáncer de mama<sup>36</sup>.

Subtipo	Media (rango) %	
	Ausente	Presente
Triple negativo	40 (9 – 60)	60 (40 – 91)
Hormonal	57 (27 – 70)	43 (30 – 73)
HER2+	39 (17- 60)	61 (40 -83)



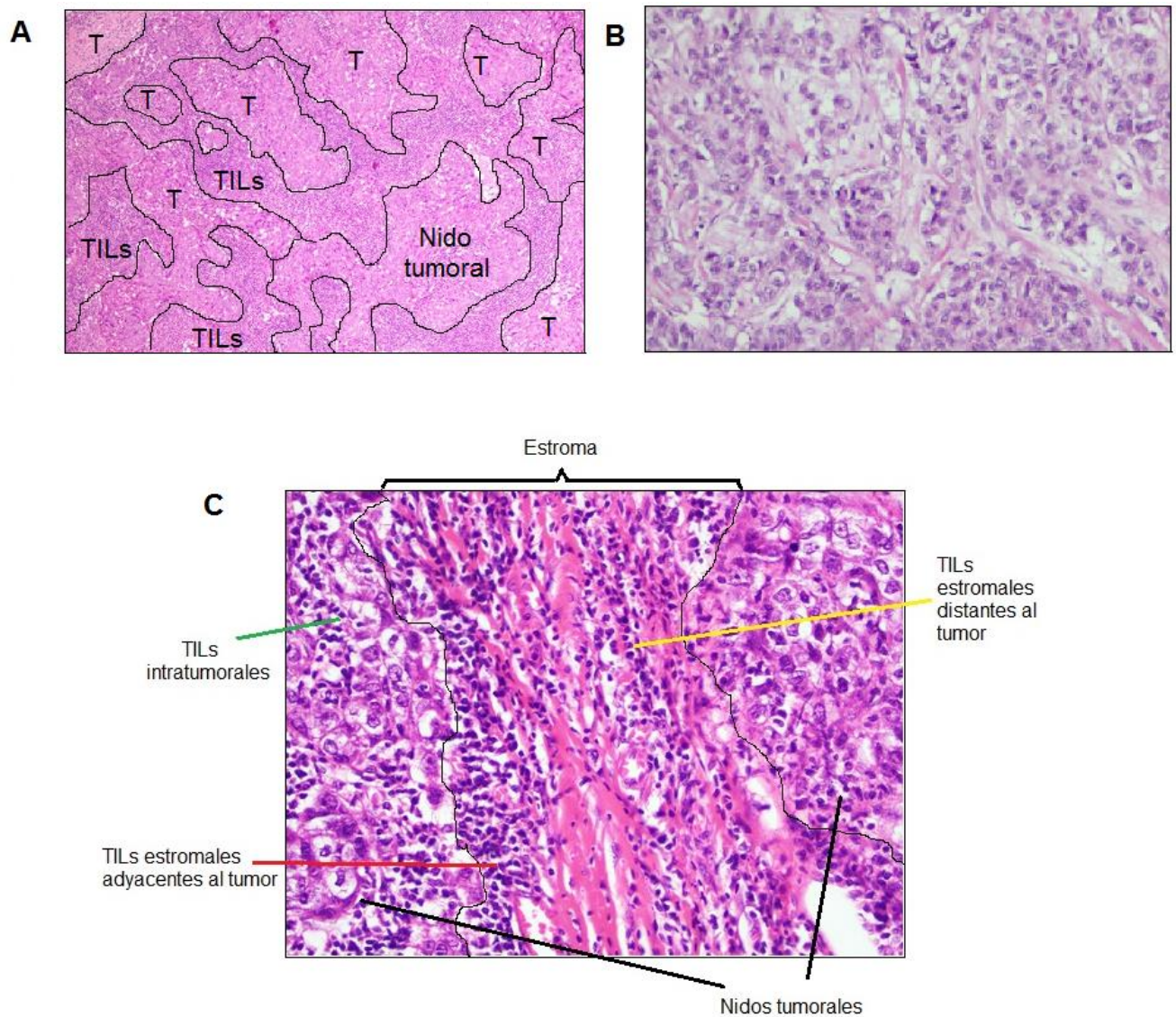
Los linfocitos Th promueven la supresión del tumor si se orientan hacia una respuesta Th1, y fomentan el crecimiento tumoral si se convierten en Th2. Los linfocitos T reguladores se encargan de regularizar una excesiva respuesta inmune, por lo que reflejan una respuesta secundaria natural al proceso inflamatorio. En general, su presencia se asocia más a una progresión tumoral ya que reduce la respuesta inmune, que aún no ha sido efectiva en la destrucción del tumor.

Las células mieloides supresoras son una población de células inmadura y se ha correlacionado con peor pronóstico en CM en estadios finales<sup>37</sup>. Los macrófagos M1 son antitumorales, y los M2 protumorales; se ha observado que su presencia también está relacionada con el tipo de tumor en cultivos celulares: células RE+ luminal favorecen la aparición de M1 a diferencia de células triple negativo, que generan más M2<sup>38</sup>. Los macrófagos también podrían expresar PD-L1/PD-L2, que inhiben a los linfocitos T citotóxicos, promoviendo el crecimiento del tumor<sup>39</sup>.

Los linfocitos B son más escasos y se suelen encontrar en la periferia del tumor adyacente al tejido normal formando centros germinales junto con los linfocitos T foliculares. El centro germinal rodeado de linfocitos T son las llamadas estructuras linfáticas terciarias (TLS, del inglés *Tertiary Lymphoid Structures*), que se describen en el apartado 3.3, y están asociadas a buen pronóstico<sup>40</sup>.

### **3.2. Subtipos de *Tumor Infiltrating Lymphocytes* según su localización**

Los TILs se dividen principalmente en TILs estromales e intratumorales, según estén en el estroma o dentro de los nidos tumorales, respectivamente (Figura 12A). Hay tumores que no presentan ninguna célula inmune, como la muestra de la Figura 12B. Algunos autores dividen a los TILs estromales en TILs estromales adyacentes al tumor, si están en el borde del tumor, y TILs estromales distantes al tumor, si están dentro del estroma sin tener contacto con las células cancerígenas (Figura 12C). También cabe destacar los TILs periféricas, que están en los límites de todo el área tumoral y que pueden estar presentes en tumores sin infiltración linfocitaria.

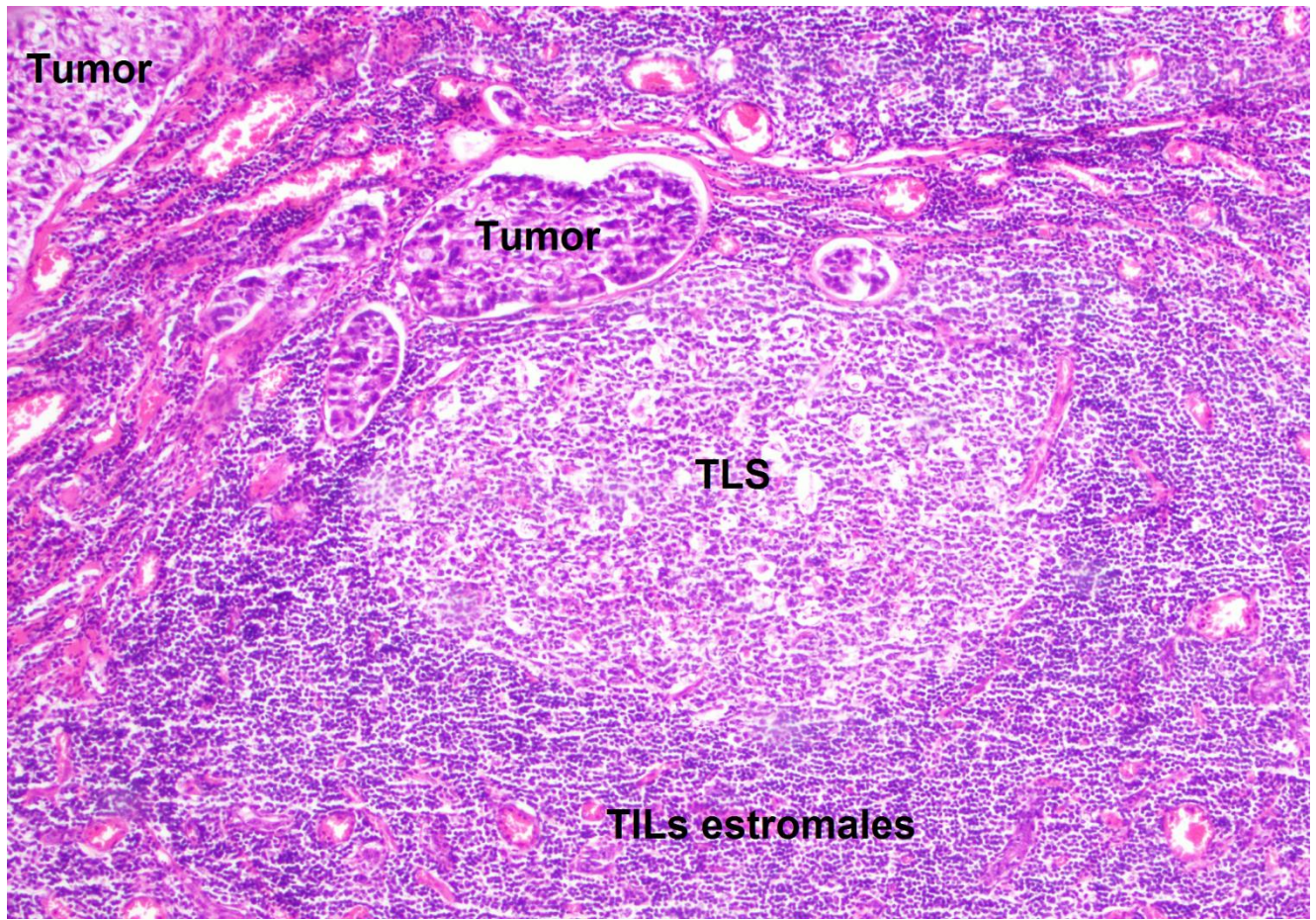


**Figura 12.** Imágenes de tumores ricos y pobres en TILs, y los diferentes tipos de TILs. A) Tumor rico en TILs, en el que los nidos tumorales están rodeados por gran cantidad de TILs estromales (x4). B) Tumor pobre en TILs (x20). C) Tipos de TILs según su localización (x20).

### 3.3. Estructuras linfáticas terciarias

Las estructuras linfáticas terciarias o más conocidas por sus siglas en inglés TLS (*Tertiary Lymphoid Structures*) son agregados inmunes ectópicos que se forman en la periferia tumoral y que constan de uno o varios centros germinales rodeados de linfocitos T (Figura 13).

El centro germinal está formado por linfocitos B y por Tfh que promueven la activación de los linfocitos B. En un estudio se vio que una alta expresión de CXCL13, una quimiocina que favorece la unión entre estas dos células, estaba asociada con mayores tasas de respuesta completa a la QT antes de la cirugía<sup>40</sup>.



**Figura 13.** Estructuras linfáticas terciarias (TLS) (x10). TILs: *Tumor Infiltrating Lymphocytes*

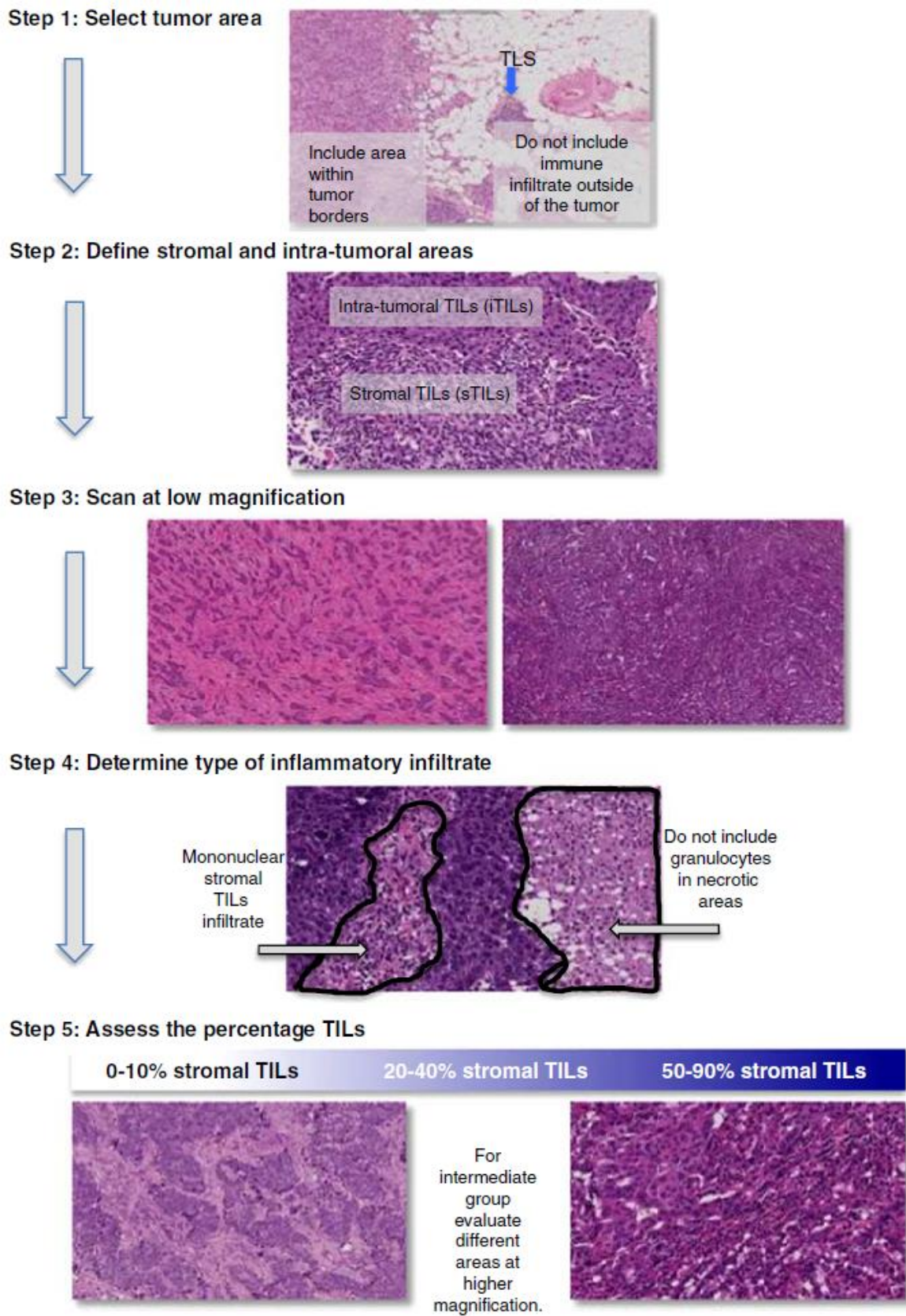
### 3.4. Guías para la evaluación de los *Tumor Infiltrating Lymphocytes*

En 2015 se publicaron las primeras guías de evaluación de los TILs en CM después de la reunión del *International TILs Working Group 2014*, formada principalmente por patólogos<sup>41</sup>. Dos años más tarde, salieron unas nuevas guías de recomendación del mismo grupo, que ahora se llama *International Immuno-Oncology Biomarker Working Group*, publicadas en dos artículos en los que además añadían recomendaciones no solo para CM infiltrante, sino también para carcinoma ductal infiltrante *in situ* (DCIS, del inglés *ductal carcinoma in situ*) y enfermedad residual después de neoadyuvancia en CM<sup>33</sup>, así como la evaluación de los TILs en otros tipos de cánceres diferentes al de mama<sup>42</sup>. En ellas se dan una serie de pasos para hacer la medida de los TILs, y entre otras cosas, no se consensuó ningún punto de corte, y recomendaban considerar la presencia de TILs como una variable continua (Tabla 7 y Figura 14).

**Tabla 7.** Recomendaciones de evaluación de los *Tumor Infiltrating Lymphocytes*

<b>Guía para la evaluación de los <i>Tumor Infiltrating Lymphocytes</i> en cáncer de mama</b>
<p>1) Los TILs se deberían de reportar según su componente estromal (% de TILs estromales) y su componente intratumoral (% TILs intratumorales). Las razones son a) en muchos tumores la densidad de TILs en ambos compartimentos es diferente, y b) si los TILs se evalúan simplemente por el área tumoral, la densidad y patrón de crecimiento de las células tumorales (un parámetro no inmune) podría afectar al recuento de TILs El denominador para determinar el % de TILs estromales es el área del tejido estromal (el área ocupada por células inflamatorias mononucleadas sobre el total del área estromal intratumoral), y no el número de células estromales (la fracción del total de núcleos estromales que representa el núcleo de células inflamatorias mononucleadas). Igualmente, para los TILs intratumorales, el área de células tumorales es el denominador</p>
<p>2) Los TILs se deberían de evaluar dentro del borde del tumor invasivo, incluyendo el <i>tumor central</i> y el <i>margen invasivo</i>. Esas áreas se pueden informar por separado cuando sea necesario</p>
<p>3) El margen invasivo es el que se define como la región de 1 mm centrada en el borde que separa los nidos tumorales del tejido normal. El tumor central representa el resto del área tumoral</p>
<p>4) Descarta los TILs que están a distancia del borde tumoral. Los TILs inmediatamente adyacentes al margen invasivo, los TILs peritumorales, se pueden evaluar cuando se necesite</p>
<p>5) Descarta los TILs en zonas del tumor con artefactos de aplastamiento, necrosis, hialinización regresiva, así como la zona donde se ha realizado una biopsia</p>
<p>6) Todas las células mononucleadas (incluidos linfocitos y células plasmáticas) deberían de ser valoradas, pero los leucocitos polimorfonucleares deberían de ser excluidos</p>
<p>7) Una sección (4-5 mm, aumentos de x200 a x400) por paciente se puede considerar suficiente a efectos prácticos. Sin embargo, se recomienda valorar secciones adicionales por cada caso cuando sea posible, e informar del número de secciones revisadas por caso especificándolo en el manuscrito, ya que se desconoce el grado de heterogeneidad de los diferentes tipos de tumor</p>
<p>8) Se recomiendan secciones completas mejor que biopsias cuando sea posible. Aunque se pueden usar, no se ha validado ninguna metodología para evaluar TILs en las biopsias obtenidas en el marco preterapéutico neoadyuvante</p>
<p>9) Los patólogos deben hacer una media de los TILs en toda el área tumoral y no centrarse en las zonas con mucha presencia de TILs</p>
<p>10) Los TILs deberían de ser evaluados de manera continua, ya que proporcionan mayor información biológica y permiten análisis estadísticos más precisos. Sin embargo, en la práctica diaria, los patólogos raramente valorarán los TILs como 13,5%, sino que lo redondearán al 15%. El patólogo debería de reportar sus evaluaciones con el mayor detalle posible con el que se sienta cómodo</p>
<p>11) Para la valoración del porcentaje, se tiene que tener en cuenta el patrón de crecimiento irregular de los linfocitos. Los TILs estromales deberían de ser evaluados como un parámetro continuo. El porcentaje de TILs estromales es un parámetro semicuantitativo para esta evaluación. Por ejemplo, 80% de TILs estromales significa que el 80% del área estromal muestra una densa infiltración mononuclear. Estos no forman típicamente agregados celulares sólidos, por lo que la denominación de “100% de TILs estromales” definiría una zona en la que también habría espacio vacío entre los linfocitos</p>
<p>12) No se hace ninguna recomendación formal sobre cuál sería el/los punto/s de corte recomendados para los TILs. El consenso fue que una metodología validada era más importante que las cuestiones sobre el uso de los puntos de corte en la práctica clínica, que se determinará cuando se haya puesto una metodología sólida en marcha</p>

Fuente: *International Immuno-Oncology Biomarker Working Group*, publicadas en 2017<sup>33</sup>.



**Figura 14.** Método estandarizado para la evaluación de los TILs recomendado por el *International TILs WorkingGroup*<sup>33</sup>

#### 4. Tumor Infiltrating Lymphocytes y su valor predictivo y pronóstico en cáncer de mama

La mayoría de los estudios que evaluaban el valor predictivo de los TILs se han hecho de manera retrospectiva partiendo de las biopsias de ensayos clínicos. Aunque muchos de ellos englobaban todos los subtipos de cáncer, donde más se han estudiado ha sido en los cánceres con mayor presencia de TILs: el cáncer HER2+ (especialmente en relación con el trastuzumab), y el CMTN. En este último ha sido especialmente importante debido a la ausencia de fármacos distintos de la quimioterapia y a la necesidad de optimizar el tratamiento y mejorar el pronóstico.

##### 4.1. Prevalencia en cáncer de mama

Una revisión sistemática realizada por Stanton *et al.*, en 2016<sup>36</sup> evaluó el porcentaje de infiltración linfocitaria en CM y las diferencias entre los subtipos hormonal+, HER2+ y triple negativo. En esta revisión se vio que el 11% (5-26%) del CM tenían el fenotipo LPBC (del inglés *Lymphocyte-predominant breast cancer* o CM con predominio linfocitario), definido como TILs estromales  $\geq 50$  o  $\geq 60\%$ ) y un 16% no tenían ninguna TILs<sup>43</sup>. Entre los subtipos, los que mayor infiltración linfocitaria tenían era el triple negativo (20% de media) y el HER2+ (16%), y el que menos el hormonal+/HER2- (6%), (Tabla 8). La mayoría de las pacientes (84%, rango 74-95%) tienen una infiltración intermedia. Esto ha hecho que algunos autores prefieran evaluar los TILs de manera continua (considerando aumentos del 10%) y correlacionándolo con una disminución en el riesgo de recaída y muerte<sup>44</sup>.

**Tabla 8.** Incidencia de *Tumor Infiltrating Lymphocytes* según el subtipo de cáncer de mama<sup>36</sup>

Subtipos	Número de pacientes	Media (%)		
		Nada*	< 49%	LPBC (rango)
Triple negativo	1.640	15 (10-20)	80 (60-89)	20 (4-37)
Hormonal +	2.410	20	94 (88-97)	6 (3-12)
HER2+	929	9	84 (86-89)	16 (11-24)

\*Estos datos corresponden a un solo estudio con pacientes con tumores con receptores hormonales y HER2+.LPBC: *Lymphocyte-predominant breast cancer*.

En un estudio publicado por Adams *et al.*<sup>45</sup> se vio que la probabilidad de que un CMTN tuviera 0% de sTILs estaba inversamente relacionado con el número de ganglios linfáticos positivos, siendo un 25,7% para tumores con ganglios negativos, un 18,1% para tumores con 1-3 ganglios positivos, y un 10,6% para tumores con más de tres ganglios afectados.

#### **4.2. Valor pronóstico y predictivo de los *Tumor Infiltrating Lymphocytes* en neoadyuvancia**

La neoadyuvancia en CM ha tomado un gran papel en los últimos años. No es el objetivo de esta tesis definir las virtudes del tratamiento neoadyuvante, pero como introducción, cabe resaltar que la mayoría de pacientes con tumores triple negativos o HER2 suelen recibir este tipo de tratamiento a pesar de tener tumores muy pequeños. Se considera la respuesta completa patológica (RCp) como un marcador subrogado pronóstico después de este tratamiento.

En varios estudios se ha visto que la QT neoadyuvante basada en antraciclinas y taxanos (especialmente paclitaxel) provoca muerte celular y hace que se estimule el SI a través de la presentación de antígenos tumorales de las células dendríticas a los linfocitos T citotóxicos<sup>46,47</sup>. Igualmente, en tumores HER2+, también se ha visto que la adición de trastuzumab a la neoadyuvancia tiene una doble acción: primero, induciendo la atracción de macrófagos y NK que atacan de manera inespecífica las células del cáncer (inmunidad mediada por el anticuerpo HER2); y después, con la liberación de antígenos tumorales y su presentación por las CPA), atrayendo a los linfocitos T citotóxicos que generan una respuesta más específica<sup>48,49,50</sup>.

Además de la presencia o no de TILs en el diagnóstico, también es importante saber qué subtipos de TILs están presentes y si están activados o no. En un estudio se vio que la mayoría de los TILs eran linfocitos CD3+ CD4+ (T colaboradores) y CD3+ CD8+ (T citotóxicos), y muy pocas células B o NK, y también se observó que los linfocitos CD3+ CD8+ no expresaban granzima B antes del tratamiento de neoadyuvancia (sugiriendo que no estaban activados), pero que sí que lo hacían después del tratamiento un tercio de las pacientes<sup>32</sup>.

Se han hecho varias investigaciones para evaluar el valor pronóstico y predictivo de los TILs en el CM, ya sea antes o después de la neoadyuvancia. Los estudios más importantes se han resumido en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Resumen de los estudios neoadyuvantes que han realizado análisis de los *Tumor Infiltrating Lymphocytes*.

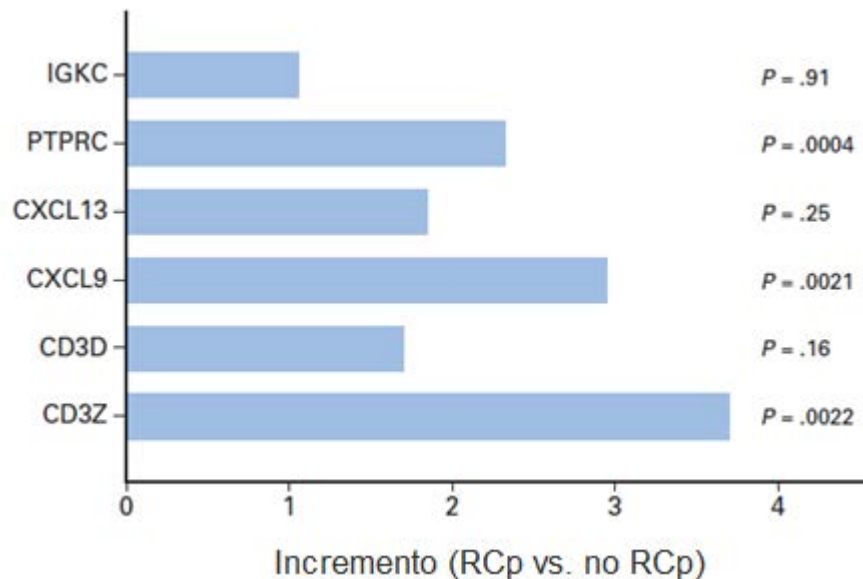
Ensayo	Tratamientos	Subtipo	N	RCp
GeparDuo <sup>43</sup>	Doxorrubicina Docetaxel Ciclofosfamida	Todos	218	OR 1.36 de RCp por cada 10% de incremento en las iTILs (95% IC: 1.08-1.78, p = 0.012)
GeparTrio <sup>43</sup>	Doxorrubicina Docetaxel Ciclofosfamida Vinorelbina Capecitabina	Todos	840	OR 1.21 de RCp por cada 10% de incremento de las iTILs (95% IC: 1.08-1.35, p = 0.001)
NeoALTTO <sup>51</sup>	Trastuzumab Lapatinib Paclitaxel FEC	HER2+	387	Por cada 1% incremento de TILs se asocia un 3% de disminución de tener recaída [HR 0.97 (95% IC 0.95-0.99, p = 0.002)] RCp: TILs > 5% está asociado a una mayor tasa de RCp [OR 2.60 (95% IC: 1.26-5.39, p = 0.01)]
GeparQuattro <sup>52</sup>	Epirubicina Ciclofosfamida Docetaxel Capecitabina Trastuzumab	HER2+	156	OR 1.16 de RCp por cada 10% de sTILs (95% IC: 1.01-1.32, p = 0.038)
CHER-LOB <sup>53</sup>	Trastuzumab y/o lapatinib Paclitaxel FEC	HER2+	105	Por cada 10% de incremento en iTILs y sTILs está asociado un probabilidad más alta de tener RCp (OR ajustado: 2.64, 95% IC: 1.46-4.79, p = 0.001 y 1.32, 95% IC: 1.08-1.6, p = 0.006, respectivamente)
GeparSixto <sup>54</sup>	Paclitaxel Liposomal Doxorrubicina Carboplatino Bevacizumab Trastuzumab	HER2+ y RE-/HER2-	580	OR 1.2 de RCp por cada 10% de sTILs (95% IC: 1.11-1.29, p < 0.001) Test significativo para la interacción entre las TILs y la respuesta a la terapia de carboplatino)
GeparQuinto <sup>55</sup>	Epirubicina Ciclofosfamida Taxano	RE+ y RE-/HER2-	313	OR 1.2 de RCp por cada 10% de sTILs (95% IC: 1.0-1.3, p = 0.01)
EORTC 10994 y BIG 00-01 <sup>56</sup>	FEC Docetaxel	RE-	111	Altos niveles de gTILs: RCp 74.2% Bajos niveles de gTILs: RCp 31.3% OR 6.42 de RCp entre altos versus bajos gTILs (95% IC: 2.08-19.83, p = 0.001)

RCp: Respuesta Completa patológica; RE: Receptor de Estrógeno; OR: del inglés *Odds Ratio*; HR: del inglés *Hazard Ratio*; IC: intervalo de confianza; iTILs = intratumoral TILs; sTILs: estromal TILs; gTILs: expresión génica de las TILs; FEC: fluorouracilo, clorhidrato de epirubicina y ciclofosfamida.

Fuente: adaptado de Wein *et al.*<sup>57</sup>.



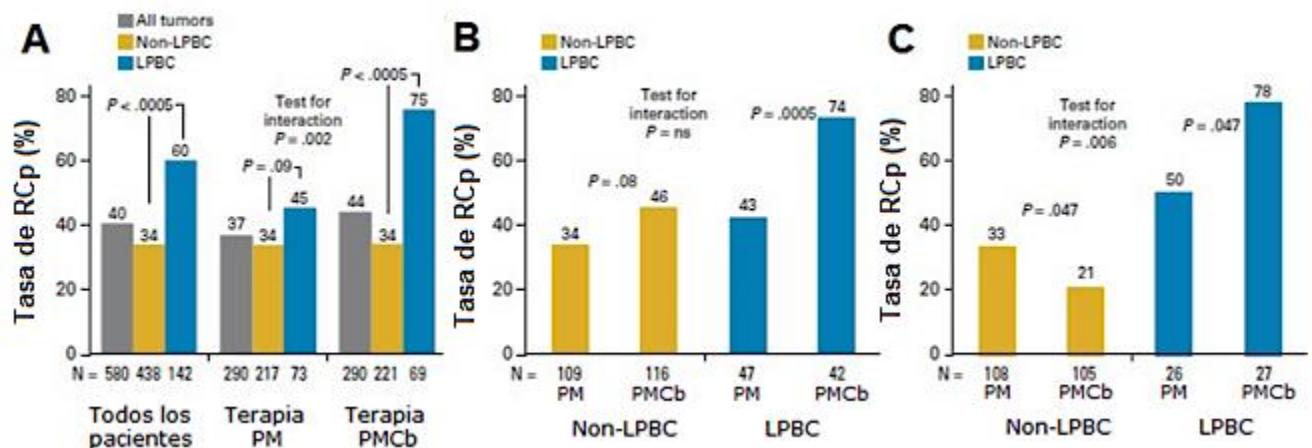
Uno de los estudios que ha evaluado el valor predictivo es el realizado por Denkert *et al.* en 2010<sup>43</sup>. El estudio se realizó con biopsias pretratamiento de dos ensayos clínicos neoadyuvantes basados en taxanos y antraciclinas: 218 del GeparDuo (cohorte de entrenamiento) y 840 del GeparTrio (cohorte de validación). Se hizo un estudio inmunohistoquímico de todas las muestras para medir los TILs (primero, con hematoxilina y eosina y después con los marcadores CD3, CD20 y CXCR3) y también un análisis de expresión génica de marcadores relacionados con el SI en 134 biopsias del GeparTrio. Se objetivó una mayor RCp en pacientes con altos niveles de TILs (LPBC, > 60%) comparado con las de niveles bajos por las pruebas de IHQ (42 vs. 3% en la cohorte de entrenamiento,  $p=0.012$ ; y 40 vs. 7% en la cohorte de validación,  $p=0.001$ ). En las pruebas de expresión génica se vio que el marcador que más correlacionaba con la RCp era el CD3Z ( $p = 0.0022$ ), que identifica a los linfocitos T (Figura 15).



**Figura 15.** Relación entre el incremento de expresión génica de seis marcadores inflamatorios con la RCp. El PTPRC (CD45), CXCL9 y el CD3Z están significativamente más expresados en pacientes con RCp que en los que no la alcanzan. RCp: Respuesta Completa patológica  
Imagen: tomada de Denkert *et al.*<sup>43</sup>.

Es importante señalar que en este estudio no solo se incluía a pacientes triple negativo, que suelen ser los que tienen niveles más altos de TILs y mejor responden a la QT; igualmente se observa el aumento de RCp en pacientes con altos niveles de TILs al inicio de la neoadyuvancia. Esta tendencia también se observó en otros estudios, como en los análisis del GeparQuinto<sup>55</sup>, que estudiaba la RCp en pacientes HER2 negativo que se sometían a neoadyuvancia basada en antraciclinas y taxanos, donde los pacientes LPBC tenían un RCp de 36.6% en comparación con el 14.3% de las non-LPBC ( $p<0.001$ ).

En los análisis del GeparSixto<sup>54</sup>, donde las pacientes se sometían a neoadyuvancia basada en antraciclinas y taxanos con o sin carboplatino, esta tendencia también se ha visto (59,9% para LPBC vs. 33,8% non-LPBC,  $p < 0.001$ ). En un subanálisis que comparaba la RCp de las pacientes que habían recibido carboplatino con las que no, y se observó que el 75% de las pacientes con altos niveles de TILs del grupo de carboplatino alcanzaban la RCp, en comparación con las que tenían niveles bajos, que eran solo el 34% ( $p < 0.005$ ) (Figura 16A). En el grupo sin carboplatino este efecto era mucho más bajo (45 vs. 34%,  $p = 0.09$ ) (Figura 16A). En el subestudio por cohortes, las pacientes con niveles altos de TILs alcanzaban mayor respuesta completa si recibían carboplatino que las que no tanto en la cohorte de triple negativo (43 vs. 74%,  $p = 0.0005$ ) como de HER2+ (50 vs. 78%,  $p = 0.047$ ), (Figura 16B y Figura 16C)<sup>54</sup>. En este estudio, el 19,9% de las pacientes HER2+ y el 28,3% de las triple negativo eran LPBC, un porcentaje más alto que la media (16% para las HER2+ y 20% para las triple negativas<sup>36</sup>).



**Figura 16.** Tasa de RCp del GeparSixto según la presencia de TILs. A) Tasa de RCp según los niveles de TILs en el tumor (todos, LPBC, non-LPBC) en todas las pacientes, en las pacientes que no recibieron carboplatino (terapia PM) y las que sí lo recibieron (terapia PMCb). B) Tasa de RCp en pacientes triple negativo. C) En pacientes HER2+

RCp: Respuesta Completa patológica; LPBC: *Lymphocyte Predominant Breast Cancer*, PM: paclitaxel más doxorubicina liposomal no pegilada; PMCb: PM más carboplatino; ns: no significativo.

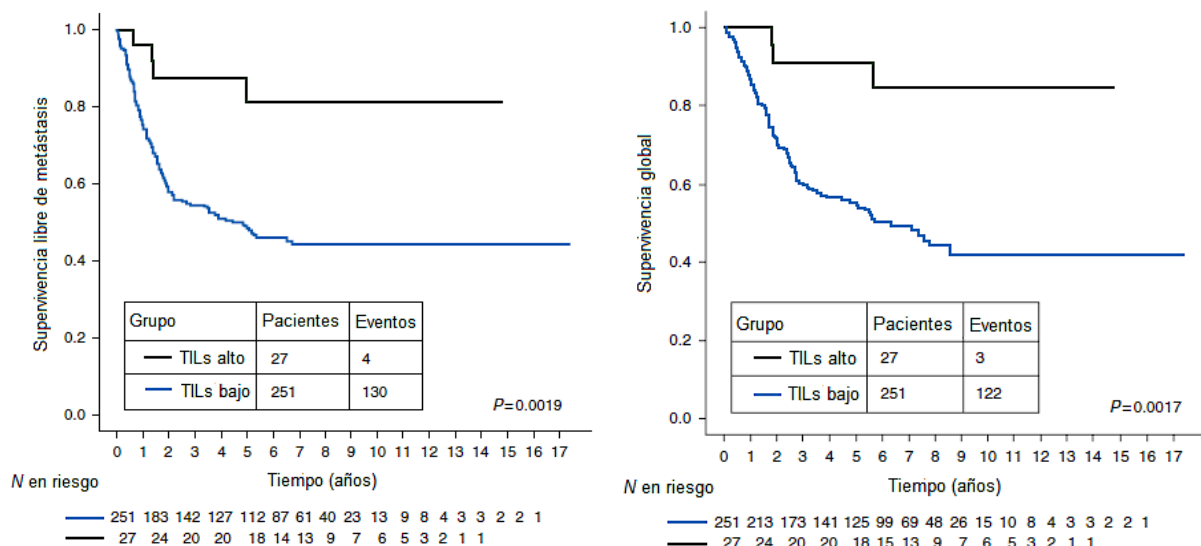
Fuente: adaptada de Denkert *et al.*<sup>54</sup>

Otro de los estudios importantes sobre el valor predictivo de las TILs en neoadyuvancia fue el desarrollado por West *et al.*<sup>56</sup>. El estudio analizó la expresión génica de las 113 pacientes RE- (de las cuales, 71% triple negativo) que participaron en el ensayo clínico EORTC 10994/BIG 00-01, donde se trataban con antraciclinas. Se seleccionaron ocho genes que correlacionaban con la presencia de TILs al diagnóstico para definir tres grupos de pacientes con niveles altos, bajos e intermedios de TILs. Se observó que 23 de las 31 pacientes (74%) con niveles altos de TILs alcanzaban la RCp en comparación con las 25 de las 80 pacientes (31%) con niveles intermedios y

bajos. Estos mismos resultados se vieron en un subanálisis de las pacientes triple negativo. Cuando esta firma de genes se quiso aplicar a una cohorte de cisplatino neoadyuvante, se vio que no correlacionaba la respuesta con los niveles altos de TILs.

Además, de los ocho genes seleccionados, solo los seis expresados en los linfocitos T correlacionaban con RCp y no los dos de los linfocitos B. Por tanto, los linfocitos T parecen ser el subtipo de TILs más importante. De entre los seis genes de los linfocitos T, la granzima B era el que más estaba asociado con la RCp y su probabilidad se equiparaba a la media de los ocho marcadores.

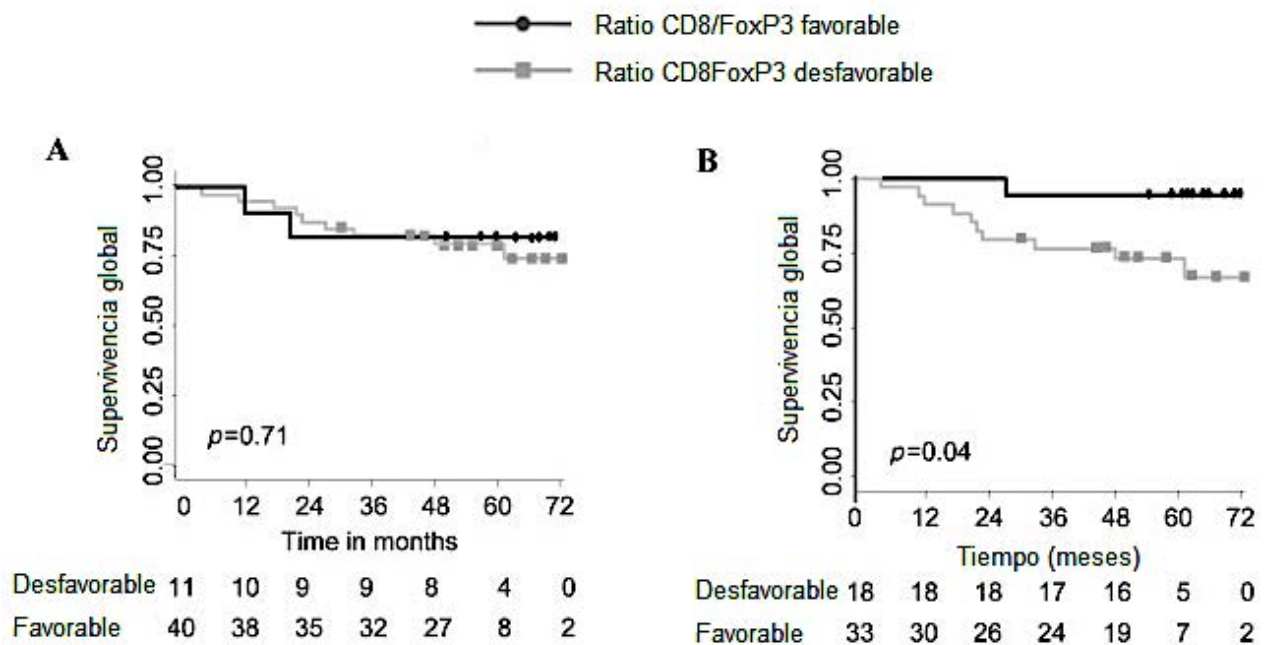
En un estudio realizado por Dieci *et al.*, en 2014<sup>58</sup> evaluó en 278 pacientes triple negativo el valor pronóstico de los TILs en la enfermedad residual después de la neoadyuvancia. En este trabajo se vio que cada incremento del 10% de TILs en la enfermedad residual el riesgo de metástasis y muerte se reducía un 21% (*Hazard Ratio* [HR] 0,78, 95% intervalo de confianza [IC] 0,71-0,88 y HR 0,79 95% IC 0,71-0,89). Cuando se evaluaron los TILs en dos grupos (TILs+ llamado LPBC > 60% y TILs bajo ≤ 60%), se vieron los siguientes resultados en supervivencia libre de metástasis (Figura 17A) y SG (Figura 17B): las pacientes con niveles altos de TILs en la enfermedad residual tenían una supervivencia libre de metástasis a cinco años del 81,5% (95% IC 57-93%), mientras que las que tenían niveles bajos solo un 46% (95% IC 42-55%); para la SG; las pacientes con niveles altos de TILs tenían una probabilidad de 91% (95% IC 68-97%) de seguir vivas después de cinco años, mientras que las de niveles bajos tenían una probabilidad del 55% (95% CI 48% al 61%).



**Figura 17.** Gráfica de Kaplan-Meier de A) Supervivencia libre de metástasis en pacientes con niveles altos de TILs (> 60%) y niveles bajos (≤ 60%) en la enfermedad residual después de la neoadyuvancia. B) Supervivencia global en pacientes con niveles altos de TILs (> 60%) y niveles bajos (≤ 60%) en la enfermedad residual después de la neoadyuvancia.

Fuente: adaptada de Dieci *et al.*<sup>58</sup>

En otro estudio llevado a cabo por Ladoire *et al.*, en 2011<sup>47</sup> se evaluó el ratio CD8/FoxP3 antes y después de la neoadyuvancia basada en antraciclinas en pacientes triple negativo, y antraciclinas y taxanos con o sin trastuzumab en pacientes HER2+. Para las HER2+, se ha visto que la infiltración evaluada por el ratio CD8/FoxP3 al inicio de la neoadyuvancia no está asociada con mejor SLP o SG, pero sí que lo está la cantidad de infiltración después del tratamiento con independencia de si había alcanzado la respuesta completa y si había recibido trastuzumab. También se observó que esta infiltración correlacionaba con la RCp (HR 6,28, CI 2,42-16,27,  $p < 0,0001$ ). Para las pacientes triples negativos, solo se observó una disminución del marcador FoxP3 (51 al 26% de las muestras), pero apenas ningún cambio en CD8 (del 59 al 51%). El ratio que correlacionaba con la SLP o con la SG (Figura 18) era en la muestra de la cirugía.



**Figura 18.** Gráficas de Kaplan-Meier para la supervivencia global de 51 pacientes triple negativo estratificadas según el ratio CD8/FoxP3 favorable o desfavorable en A) antes y B) después de la neoadyuvancia.

Fuente: adaptado de Ladoire *et al.*<sup>47</sup>

### 4.3. Valor pronóstico y predictivo de los *Tumor Infiltrating Lymphocytes* en adyuvancia

Se han realizado también varios análisis del valor pronóstico y predictivo de las TILs en la adyuvancia. En la Tabla 10 se han resumido los estudios más importantes.

**Tabla 10.** Resumen de los estudios neoadyuvantes que han realizado análisis de los *Tumor Infiltrating Lymphocytes*.

Ensayo	Tratamientos	Subtipo	N	Recurrencia
BIG 2-98 <sup>59</sup>	Doxorrubicina	RE+/PR+	1.079	No significativo
	Ciclofosfamida	HER2+	297	No significativo
	CMF Docetaxel	CMTN	256	Por cada 10% de incremento de sTILs: SLP, HR=0.84 (95% IC: 0,74-0.98, p = 0.025)
FinHER <sup>44</sup>	Docetaxel	RE+/HER2-	591	No significativo
	Vinorelbina	HER2+	209	Predictivo para el beneficio del trastuzumab (p interacción = 0.025)
	FEC ± Trastuzumab	CMTN	134	Por cada 10% de incremento de las sTILs: SLPD, HR = 0.79 (95% IC: 0.64-0.98, p = 0.032)
E2197 y E1199 <sup>45</sup>	Doxorrubicina Ciclofosfamida Docetaxel	CMTN	481	Por cada 10% de incremento de las sTILs: SLP, HR = 0.84 (95% IC 0.74-0.95, p = 0.005)
IBCSG 22-00 <sup>60</sup>	CMF Antraciclinas Taxanos CM mantenimiento	CMTN	647	Por cada 10% de incremento de sTILs: intervalo libre de cáncer de mama, HR = 0.87 (95% IC 0.79-0.95, p = 0.003)
Gustave Roussy <sup>61</sup>	5 -fluorouracilo	RE+/HER2-	199	No significativo
	Doxorrubicina	HER2+	112	Por cada 10% incremento de sTILs: HR ajustado = 0.82 (85% IC 0.69-0.96, p = 0.02)
	Epirubicina Ciclofosfamida No quimioterapia	CMTN	463	Por cada 10% incremento de sTILs: HR ajustado = 0.85 (95% IC 0.74-0.99, p = 0.04)
Análisis combinado <sup>62</sup>	Antraciclinas Taxanos	CMTN	991	Incluyeron los estudios E2197, E1199, BIG 2-98, FinHER y Gustave Roussy Por cada 10% incremento de sTILs: SLP invasiva, HR = 0.86 (95% IC 0.80-0.93, p < 0.0001)
N9831 <sup>63</sup>	Doxorrubicina Ciclofosfamida Paclitaxel	HER2-	489	Sin trastuzumab, por cada 10% de incremento de sTILs: SLP a los 10 años, HR = 0.23 (95% IC 0.07-0.73, p = 0.01)
	± Trastuzumab	HER2+	456	Con trastuzumab, no significativo

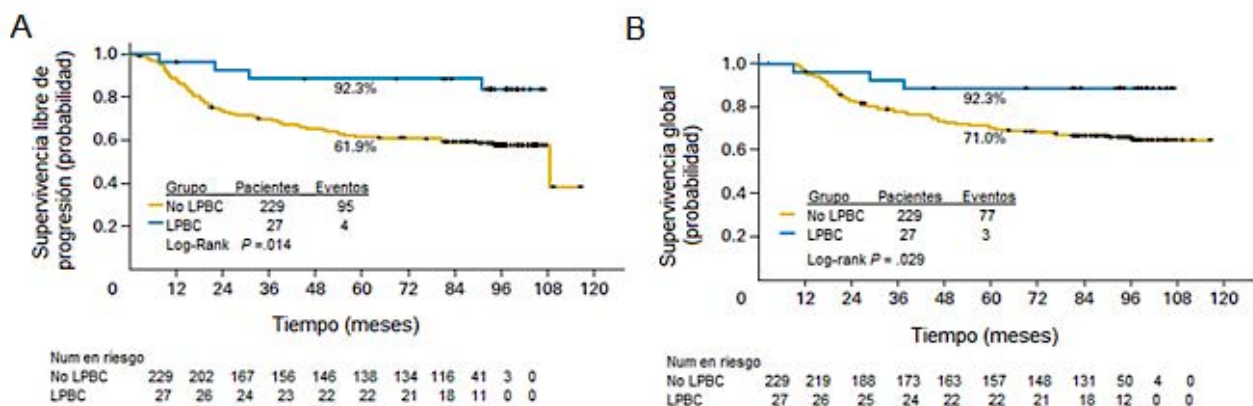
SLP: supervivencia libre de progresión; SLPD: supervivencia libre de progresión distante; HR: del inglés Hazard Ratio; IC: intervalo de confianza; iTILs = intratumoral TILs; sTILs: estromal TILs; CMF: ciclofosfamida, metotrexato y fluorouracilo; FEC: fluorouracilo, epirubicina y ciclofosfamida; CMTN: cáncer de mama triple negativo

Fuente: adaptado de Wein *et al.*<sup>57</sup>.

Uno de los estudios más importantes que evalúan el valor pronóstico y predictivo de los TILs en la adyuvancia es el publicado por Loi *et al.*, en 2013<sup>59</sup> sobre el ensayo clínico BIG 02-98. Esta investigación ofrece un periodo de seguimiento muy largo para la evaluación de la supervivencia así

como la aleatorización a antraciclinas o antraciclinas más taxanos para la evaluación de la predicción de respuesta por los TILs.

Para el valor pronóstico, se analizó la SLP y SG de dos maneras diferentes: 1) la comparación haciendo dos grupos de pacientes (TILs < 50% y TILs ≥ 50% —fenotipo LPBC—), y 2) la valoración de los TILs como variable continua por incrementos de 10%. En el primer caso, solo en las pacientes triple negativo (de las cuales el 10,6% eran LPBC) había una correlación estadísticamente significativa entre los TILs y la SLP y la SG (Figura 19). En el segundo tipo de análisis se vio que cada 10% de incremento de infiltración estromal e intratumoral había un 15 y 17%, respectivamente de reducción de riesgo de recurrencia, y un 17 y 27%, respectivamente de riesgo de muerte.

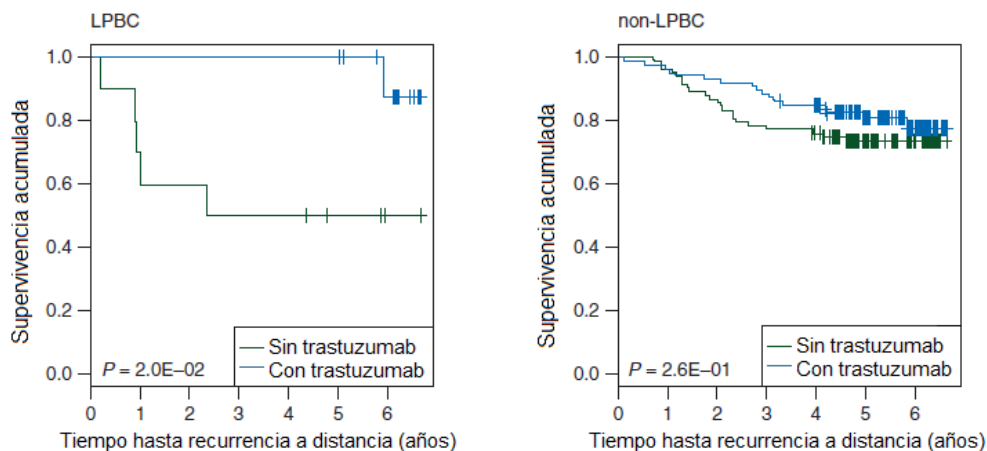


**Figura 19.** Gráficas de Kaplan-Meier para pacientes triple negativo del ensayo clínico BIG 02-98. A) Supervivencia libre de progresión. B) Supervivencia global para pacientes triple negativo con TILs < 50% (no LPBC) vs. TILs ≥ 50% (LPBC).

Fuente: adaptadas de Loi *et al.*<sup>59</sup>

Para el valor predictivo se hicieron los mismos análisis: no LPBC vs. LPBC, y los TILs como variable continua. En este caso solo se vio una correlación entre los TILs y la respuesta a los tratamientos en pacientes HER2+. Sorprendentemente, las pacientes LPBC tuvieron mayor SLP y SG en el brazo de antraciclinas pero no en el brazo de antraciclinas más docetaxel. En el caso de las pacientes no LPBC, la curvas se invierten, obteniendo mayor SLP y SG si recibieron antraciclinas más docetaxel.

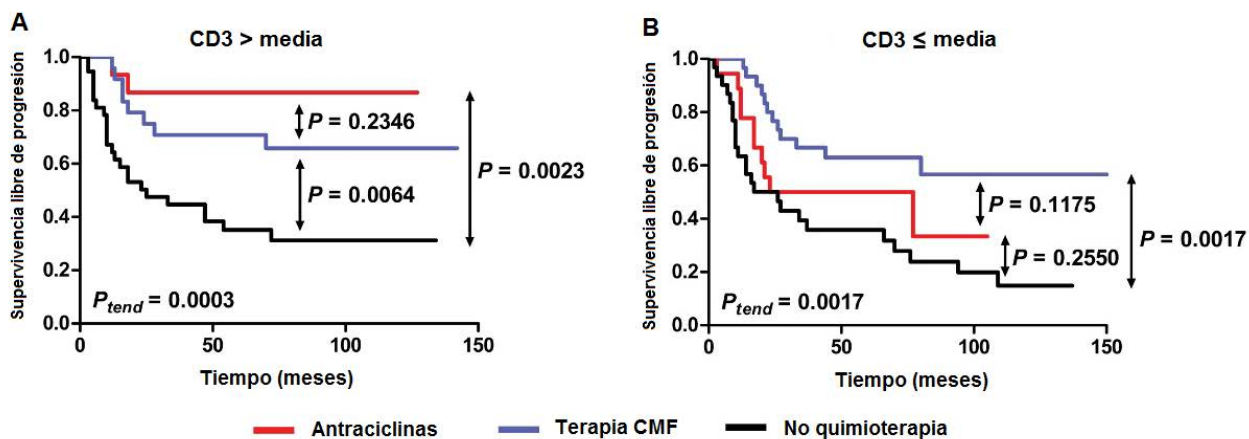
Otro estudio que valoró el valor pronóstico y predictivo de los TILs fue el de Loi *et al.*<sup>44</sup> sobre el análisis del ensayo clínico FinHER. Al igual que el anterior trabajo, solo se vio una correlación entre los TILs y la SLP y la SG en las pacientes triple negativo. En cuanto al valor predictivo de los TILs, solo se observó en las pacientes HER2+, que obtenían mayor beneficio al trastuzumab cuanto mayor infiltración linfocitaria tenían (HR 0,82 con trastuzumab vs. 1,22 sin trastuzumab) (Figura 20).



**Figura 20.** Comparación del beneficio al trastuzumab en pacientes HER2+ entre pacientes TILs  $\geq$  50% (LPBC) vs. TILs < 50% (non-LPBC).

Fuente: adaptado de Loi *et al.*<sup>44</sup>

El estudio de West *et al.*<sup>56</sup> mencionado con anterioridad, también analizó la relación entre los niveles de TILs al diagnóstico y la respuesta a las antraciclinas adyuvantes en 255 pacientes RE- (de las cuales el 61% eran triple negativo). Se vio que las antraciclinas aumentaban la SLP y la SG en pacientes con niveles altos de CD3 medido por IHQ (HR = 0,28 en ambas). La SLP a cinco años en el grupo de niveles altos de CD3 (n = 77) fue de más alta en pacientes tratadas con antraciclinas en que las pacientes que no recibieron QT adyuvante (86,7% vs. 35,1%), mientras que en pacientes con los niveles bajos (n = 79) la SLP a los cinco años fue parecida (50,0 vs. 35,8%). En las pacientes que recibieron la terapia CMF (ciclofosfamida + metotrexato + fluoruracilo) no se observó ninguna diferencia entre pacientes CD3 > media (HR = 0,37) que con los de CD3  $\leq$  media (HR = 0,34) (Figura 21). Estos mismos resultados se vieron en un subanálisis de las pacientes triple negativo.



**Figura 21.** Supervivencia libre de progresión por A) CD3 > media y B) CD3  $\leq$  media según hayan recibido antraciclinas, CMF (ciclofosfamida + metotrexato + fluoruracilo) o no quimioterapia.

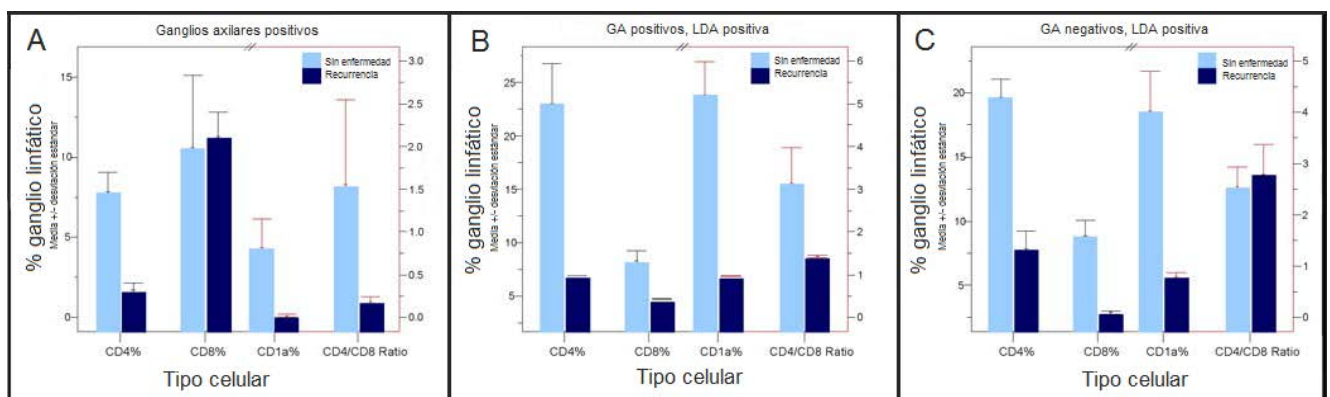
Fuente: adaptado de West *et al.*<sup>56</sup> P<sub>tend</sub> = test log-rank para la tendencia.

En este estudio también se hizo un análisis más específico para determinar la relevancia de cada subtipo de linfocito en la respuesta a las antraciclinas. Se comprobó que pacientes con niveles altos de linfocitos B CD20+ respondían mejor a las antraciclinas pero que no llegaba a ser estadísticamente significativo<sup>56</sup>. De entre los linfocitos T (CD3+), los mayoritarios eran los linfocitos T citotóxicos CD8+ (7,8 veces más que los linfocitos T ayudantes CD4+). Se vio que la respuesta a las antraciclinas correlacionaba con los CD8+ pero no con los CD4+<sup>56</sup>.

## 5. Valor pronóstico y predictivo del perfil inmunológico del ganglio linfático axilar

En la actualidad, los ganglios axilares se utilizan en el estadio del tumor, mirando la presencia o no de metástasis y su tamaño, siendo uno de los mayores predictores de supervivencia. Sin embargo, poco se ha tenido en cuenta el perfil inmunológico de los ganglios linfáticos, en especial del ganglio centinela (GC). Uno de los primeros estudios en los que se analizó el perfil inmunológico fue el de Kohrt *et al.*<sup>64</sup> en 2005. Se midió el porcentaje de CD4 (Th), CD8 (T citotóxico) y CD1a (célula dendrítica), y se compararon entre el GC, ganglios axilares no centinelas (GA) con metástasis (GA+), sin metástasis (GA-), y controles (ganglios de personas sanas). Se observó que los GA- tenían mayor porcentaje de células dendríticas que los GC, los controles y los GA+ (en este orden). También llamó la atención que GA- fueran los que tuvieran la población de células CD4+ más baja.

Para correlacionarlo con la recurrencia, se separó los GA en tres grupos: GA+ en una linfadenectomía (LFD) positiva (GA+/LFD+), GA- en una LFD positiva (GA-/LFD+) y GA- en una LFD negativa (GA-/LDA-). Se observó que las pacientes con recurrencia tenían niveles más bajos de CD4 y CD1a que los que no recaen, con independencia de la invasión ganglionar (Figura 22).



**Figura 22.** Media y desviación estándar de los porcentajes de CD4, CD8 y CD1a, separados por recurrencia o no en A) ganglios axilares positivos, B) ganglios axilares negativos en una linfadenectomía axilar positiva, y C) ganglios axilares negativos en una linfadenectomía axilar negativa. GA: ganglio axilar; LDA: linfadenectomía.

Fuente: imagen adaptada de Kohrt *et al.*<sup>64</sup>



Otra investigación que hace un análisis muy exhaustivo de los ganglios linfáticos es el que Seidl *et al.*<sup>65</sup> han publicado a comienzos del 2018. Se estudió la morfología del ganglio (centinela y axilares), el tamaño y forma de los centros germinales y la densidad del manto (véase Figura 7 para las diferentes partes del ganglio) en pacientes de CM, entre otros muchos parámetros.

Los resultados más relevantes fueron que, con independencia del subtipo histológico, se correlacionó los tumores con pT más alto con un aumento de densidad de los CG y los folículos, CG más redondos y zonas del manto más pequeñas, y los pT más bajos con CG no circulares y zonas del manto mayores<sup>65</sup> También se correlacionó a tumores con mayor grado, con mayor porcentaje de TILs, mayor densidad del CG y folículos y negativo para la infiltración cortical de macrófagos.

La densidad de los folículos y centro germinal se correlacionó negativamente con los receptores hormonales, y de manera positiva con el CMTN<sup>65</sup>, sugiriendo una mayor presentación de antígenos en los ganglios de este último tipo. Los investigadores sugieren que las pacientes con altas densidades en los CG con forma redondeada podrían responder mejor a la IT.

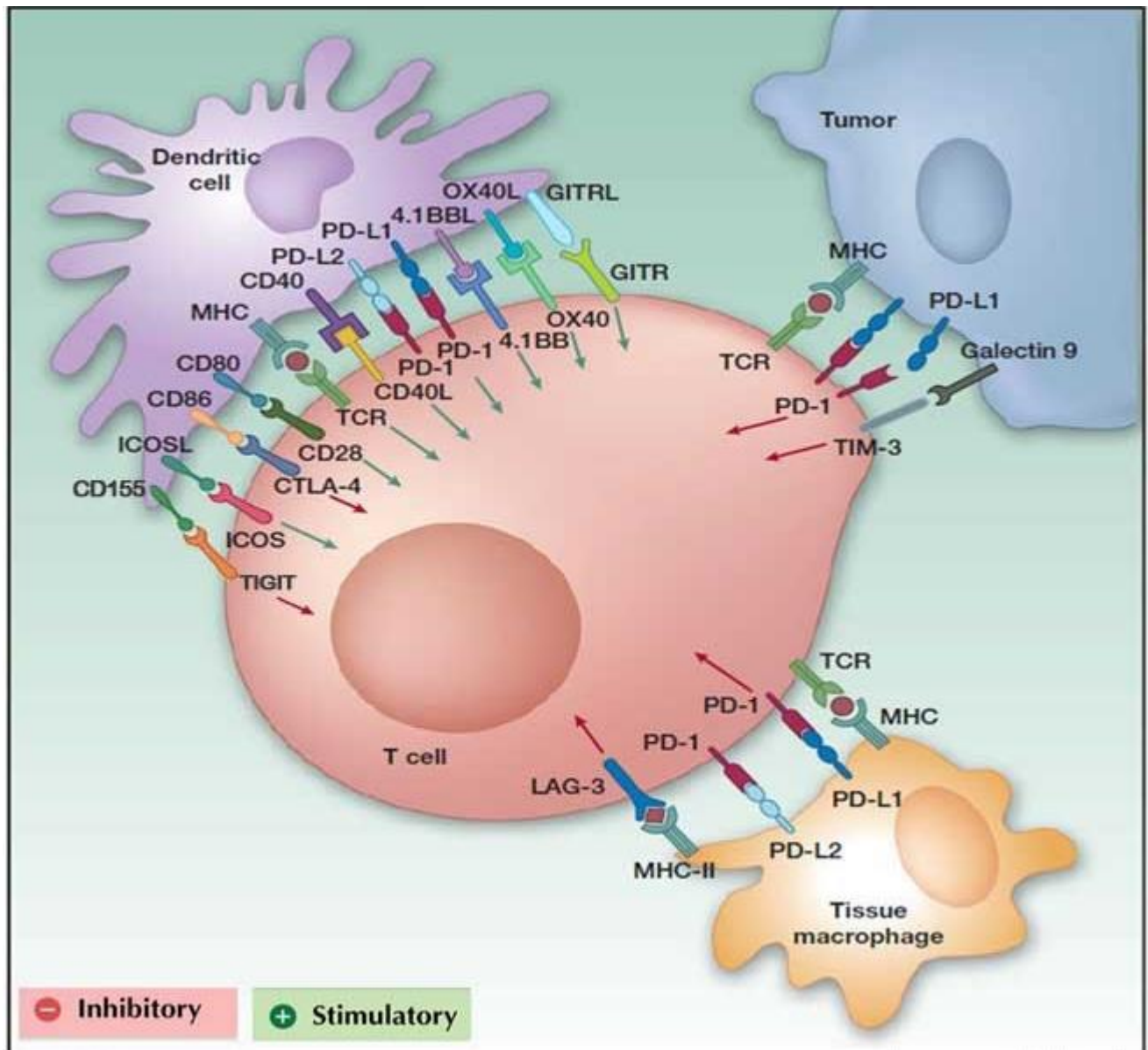
También se observó que una disminución del receptor de estrógeno correlacionaba con una reducción de la infiltración cortical de macrófagos<sup>65</sup>. Estos resultados son discordantes ya que los macrófagos, siendo CPA, deberían coincidir con el aumento de densidad de los CG y los folículos que vieron que ocurría más en las pacientes RE- y triple negativo. Los investigadores sugieren que una oposición de mecanismos influye en la población de los ganglios, o un agotamiento directo de macrófagos, que se ha llevado a cabo experimentalmente en tumores.

## **6. Immune checkpoints**

En la última década, ha cobrado cada vez más relevancia uno de los *hallmarks* del cáncer identificados más recientemente: la evasión de la respuesta inmune. Sin embargo, el uso de tratamientos inmunoterápicos (para regular el SI) no es reciente. En 1986, el Dr. Coley usó la bacteria *Streptococcus pyogenes* para tratar el sarcoma de un paciente, después de haber leído que un paciente se curó de sarcoma después de haber tenido una infección de piel, y que después de siete años seguía libre de cáncer<sup>66</sup>. Coley siguió infundiendo la bacteria a más de 1.000 pacientes, pero con el avance de la radioterapia y la QT, y las críticas de sus compañeros, su método fue cayendo en desuso.

Muchos años después, se comprobó que sus principios eran correctos y que se puede modular el SI para que sea éste el que destruya el tumor. Actualmente apenas se usan las bacterias (con excepción de la terapia del bacilo de Calmette-Guérin, conocida como terapia BCG), sino que se

están evaluando otras estrategias. Una de ellas es el diseño de anticuerpos para el bloqueo de las señales inhibitorias del cáncer a las células efectoras inmunes, así como la potenciación de la activación de estas células (Figura 23). Ya hay varias terapias aprobadas, solas o en combinación, para muchos tipos de cáncer, y hay centenas de ensayos clínicos que están testando nuevos marcadores. Otras estrategias son el diseño de vacunas o terapia con células T modificadas.



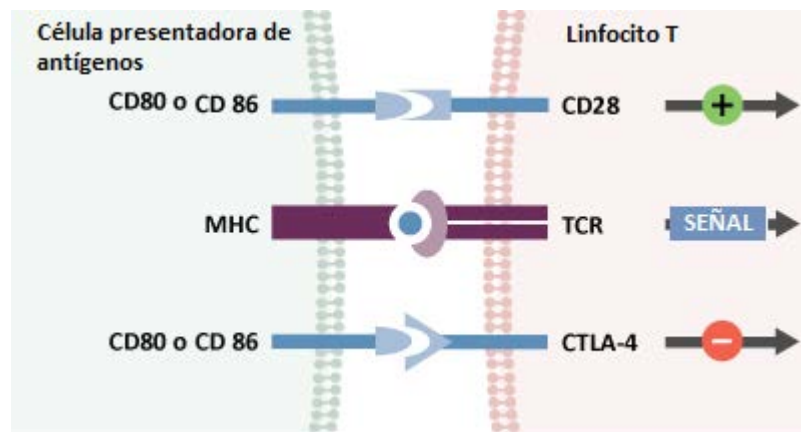
**Figura 23.** Los diferentes receptores de inhibición o estimulación inmune según su expresión en las células tumorales, macrófagos, linfocitos T y células dendríticas.

Fuente: imagen tomada de Ott *et al.*<sup>67</sup>

## 6.1. CTLA-4

El CTLA-4 o CD152 es el principal receptor implicado en la regulación negativa de los linfocitos T activados (Figura 9) en los inicios de la respuesta inmune, especialmente en los tejidos linfoides (ganglios)<sup>68</sup>. Se expresa sobre todo en la superficie de los linfocitos T efectores y constitutivamente en linfocitos T reguladores, y en menor medida en el citoplasma de los monocitos (macrófagos)<sup>69</sup>.

Tiene dos maneras de efectuar su acción: transmitiendo una señal inhibitoria a través de su región intracelular, o compitiendo con el marcador de coestimulación CD28 por los marcadores CD80 (también llamado B7.1) y CD86 (B7.2) (Figura 24)<sup>70</sup>. Cuando el CTLA-4 transmite una señal inhibitoria intracelular, la célula no libera IL-2, por lo que se bloquea la proliferación de los linfocitos. El CD28 tiene mucha menos afinidad por el CD80/CD86 que el CTLA-4, por lo que si este último está presente, prevalece el efecto inhibitorio. El CD86 está asociado más a una coestimulación del TCR ya que aparece más pronto y con más abundancia en las células dendríticas, y el CD80 se asocia más a la inhibición<sup>70</sup>. Los linfocitos T reguladores expresan constitutivamente CTLA-4 para ejercer su inhibición. También juega un papel importante en la función de los linfocitos T<sub>fh</sub> y en la forma de los centros germinales. La antagonización o deficiencia de CTLA-4 se asocia con centros germinales de gran tamaño y mal definidos, así como niveles bajos de Ig<sup>65</sup>.



**Figura 24.** Esquema de activación e inhibición del linfocito T según la expresión de CD28 o CTLA-4. MHC: *Major Histocompatibility Complex*; TCR: *T-cell Receptor*; CTLA-4: *Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein*<sup>70</sup>.

Los anticuerpos anti-CTLA-4 (abreviado aCTLA-4) ipilimumab y tremelimumab fueron los primeros *immune checkpoint inhibitors* que se aprobaron, primero en la indicación de melanoma metastásico y después en cáncer de pulmón metastásico. Se ha intentado correlacionar la expresión de CTLA-4 en el tumor por inmunohistoquímica con la respuesta a los aCTLA-4, sin éxito. Sin embargo, se ha visto

que la respuesta sí que está correlacionada con la aparición de mutaciones inmunogénicas que producen neoantígenos que pueden activar los linfocitos T<sup>71</sup>.

## 6.2. PD-1, PD-L1 y PD-L2

El receptor PD-1 está expresado en linfocitos T activados, linfocitos B, linfocitos reguladores y células NK. Tiene dos ligandos, el PD-L1 (también llamado B7-H1 y CD274) y el PD-L2 (B7-DC o CD273). Los dos ligandos compiten, teniendo el PD-L2 entre 2 y 6 veces más afinidad por PD-1<sup>72</sup>. Sin embargo, esta mayor competitividad del PD-L2 queda condicionada por su baja expresión, favoreciendo que sea el PD-L1 el ligando principal del PD-1.

El marcador PD-1 está relacionado con extenuación o agotamiento del SI, que sucede normalmente después de una estimulación crónica como el cáncer. El tumor, para evadir la respuesta inmune, expresa principalmente PD-L1 (aunque algunos expresan también PD-L2) para inhibir a los linfocitos T. El PD-L1 y el PD-L2 se expresan también en macrófagos y células dendríticas. Se cree que el PD-L2 controla la activación de los linfocitos T en los órganos linfoides (lugar de inducción), mientras que el PD-L1 lo hace en los tejidos periféricos (lugar de actuación). El PD-L1 se expresa también en células no inmunes, mientras que la expresión de PD-L2 está más restringida y depende mucho de las citoquinas liberadas por linfocitos Th2 al microambiente (especialmente la IL-4)<sup>39</sup>.

El PD-L1 se une también al B7.1 (CD80), y transmite una señal inhibitoria a los linfocitos. Algunos estudios sugieren que el PD-L2 también podría unirse a otros receptores diferentes del PD-1. Como ejemplo se vio que la infección por helmintos mejoraba con aPD-L2 pero no con aPD-1, ya que con esos anticuerpos se conseguía cambiar a respuestas Th1<sup>73</sup>.

La expresión de PD-1/PD-L1 en CM es más prevalente en tumores HER2 y triple negativo, al ser estos los que más infiltración inmune tienen. La expresión de PD-L1 se ha asociado con mayor RCp en la neoadyuvancia del CMTN y con mejor pronóstico<sup>74</sup>. En los ensayos clínicos que se están llevando a cabo con terapias aPD-1 y aPD-L1 se está valorando si podrían usarse como biomarcadores predictores de respuesta. Hasta principios del 2019, el único test CDx (del inglés, *Companion Diagnostic* o test asociado a un tratamiento) aprobado era el aPD-L1 por IHQ para varias indicaciones de pembrolizumab<sup>69</sup>. Para las otras terapias similares (nivolumab, atezolizumab y durvalumab) se habían aprobado como test complementarios (del inglés *Complimentary Diagnostic*), que guían la administración del fármaco pero que no era obligatorio realizarlo<sup>75</sup>. En marzo de 2019 se aprobó en Estados Unidos el test CDx PD-L1 para administrar atezolizumab junto con nab-paclitaxel en el cáncer de mama triple negativo metastásico, gracias a los resultados obtenidos en el IMpassion130<sup>76</sup>.

En los tumores con infiltración linfocitaria se ha visto que los linfocitos T CD8+ también expresan PD-L1. Se cree que su función es para mantener su supervivencia durante la fase de descenso de la respuesta inmunitaria y así evitar su apoptosis, según los resultados de varios modelos preclínicos<sup>77,78</sup>. Esta doble expresión de PD-L1 tanto en el tumor como en los linfocitos T citotóxicos, y la expresión de PD-1 en los linfocitos T podrían explicar las respuestas variables a las inmunoterapias aPD-1/aPD-L1.

EL PD-L2 es un biomarcador poco utilizado en el pasado pero que actualmente está tomando más relevancia. En CMTN se expresa de manera moderada/alta, según un estudio de 22 pacientes<sup>79</sup>. En ese mismo estudio se evaluó el PD-L2 en otros tumores, y se vio que en cáncer de cabeza y cuello era expresado en las células tumorales de la mitad de las muestras, a diferencia del cáncer renal y el melanoma, tumores considerados más inmunogénicos<sup>79</sup>. Por estos resultados, se valoró como biomarcador predictivo para la respuesta de pembrolizumab en cáncer de cabeza y cuello escamoso de la cohorte del ensayo KEYNOTE-012<sup>79</sup>, viendo correlación con la respuesta al tratamiento, así como mayor SG. Se está explorando este biomarcador en varios estudios con pembrolizumab<sup>80</sup>, aunque también existen fármacos en desarrollo aPD-L2 (rHIgM12B7) que se están probando en melanoma metastásico<sup>80</sup>.

A diferencia del CTLA-4, se considera que la inhibición de PD-1 ocurre más tarde en la respuesta inmune, apareciendo su expresión en los tejidos periféricos. Además, la señalización PD-1 interfiere con más cascadas de señalización que el CTLA-4<sup>68</sup>.

### **6.3. OX40**

El OX40 (CD134) es un receptor de membrana que se expresa principalmente en células Th y T citotóxicas activadas, y en menor medida en linfocitos T reguladores, células NK y neutrófilos<sup>81</sup>. No se expresa constitutivamente como el CD28, sino que es una molécula de coestimulación secundaria que aparece unos días después de la activación antigénica del linfocito. Además de la proliferación de linfocitos T, induce la producción de citocinas y la diferenciación de linfocitos CD4 de memoria.

Su ligando OX40L (CD252) también se expresa después de la activación de las CPA. Su presencia se ha relacionado con el mantenimiento de la respuesta inmune posterior a la activación de las células efectoras, y reduciendo la presencia de linfocitos T regulatorios<sup>82</sup>.

Existen varios agonistas del OX40 que se están testando en ensayos clínicos. Estos promueven la proliferación de linfocitos T CD8 a través de un aumento de los T CD4<sup>83</sup>. Además, cuando se une al OX40 expresado en un Treg inhibe la generación de más Tregs.

# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

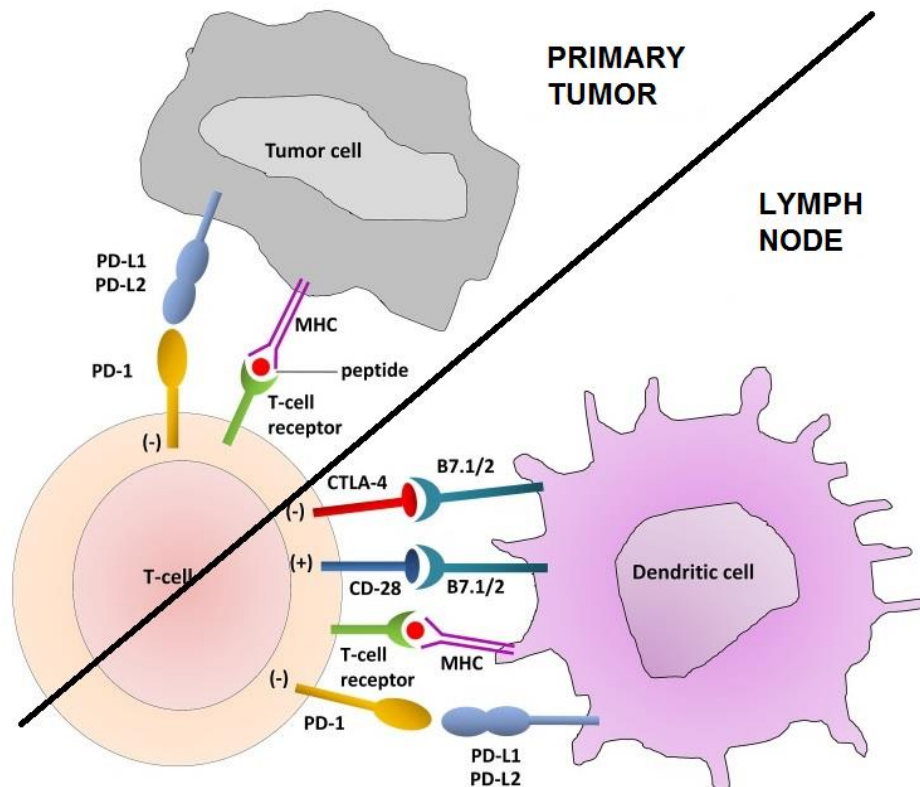
---

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 7. Hipótesis

Los trabajos y estudios realizados hasta ahora han demostrado cómo la presencia de TILs en pacientes de CMTN mejora la respuesta a tratamientos adyuvantes y neoadyuvantes, y además, cómo estas pacientes tenían un mejor pronóstico en SLP y SG. Sin embargo, no se conoce con exactitud por qué los pacientes tienen TILs al principio de la enfermedad. El presente trabajo busca entender por qué hay pacientes con CMTN que no presentan infiltración inmune al diagnóstico, ni activados ni desactivados. La hipótesis principal es que los linfocitos han quedado bloqueados en los ganglios linfáticos locales a través de uno o varios *immune checkpoint inhibitors*, y de esta manera no han podido migrar al tumor (Figura 25).

Si se consigue entender esto, se podría diseñar una secuencia de tratamientos específica contra estos mecanismos y convertir algunos tumores triples negativos no inmunológicos en tumores inmunológicos con mejor pronóstico y mejores alternativas terapéuticas.



**Figura 25.** Esquema de activación y desactivación de linfocitos T en el ganglio por las células dendríticas, y en el tumor por las células cancerígenas a través de los marcadores más importantes.

Fuente: imagen modificada de Zaravinos *et al.*<sup>84</sup>.

## 8. Objetivos

El objetivo primario es demostrar que, en el grupo de pacientes sin infiltración inmune, los linfocitos T han quedado bloqueados en los ganglios linfáticos locales a través de uno o varios *immune checkpoint inhibitors*. Se espera que sea a través del CTLA-4 o el PD-1 ya que son los primeros biomarcadores que aparecen en la inhibición de linfocitos previamente activados (Figura 25), pero también se mirará el PD-L1 y el PD-L2 que se expresan principalmente en las CPA, así como el marcador de coestimulación de OX-40. Se usará la técnica de inmunohistoquímica para evaluarlos.

Como objetivos secundarios para generar nuevas hipótesis, queremos:

- Realizar un estudio de la respuesta humoral, comparando la expresión de los biomarcadores CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2 y OX-40 por IHQ en los centros germinales en ambos grupos; y realizando un análisis cualitativo y cuantitativo de los CG y de los TLS en ambos grupos.
- Comparar la expresión de los biomarcadores CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2 y OX-40 por IHQ en el tumor de ambos grupos, y hacer una correlación entre la expresión de PD-L1 en las células tumorales con la expresión de PD-L1 en las TILs y con el tamaño del tumor como variables dicotómicas en pacientes con niveles altos de TILs.
- Realizar un análisis cualitativo de la tinción de los diferentes anticuerpos en las muestras de ganglio y tumor, y comparar la tinción de los diferentes biomarcadores en una misma zona, usando también el anticuerpo CD8 para identificar los linfocitos T citotóxicos
- Comparar la expresión de 50 genes inmunes por la técnica de NanoString con análisis:
  - entre el ganglio y el tumor de todas las pacientes
  - entre las parejas tumor-ganglio de todas las pacientes
  - entre el ganglio y el tumor de las pacientes con niveles altos de TILs
  - entre el ganglio y el tumor de las pacientes con niveles bajos de TILs
  - entre el tumor de pacientes con niveles altos de TILs y pacientes con niveles bajos;
  - entre los ganglios de pacientes con niveles altos de TILs y pacientes con niveles bajos





# **MATERIALES Y MÉTODOS**

---

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 9. Pacientes y muestras

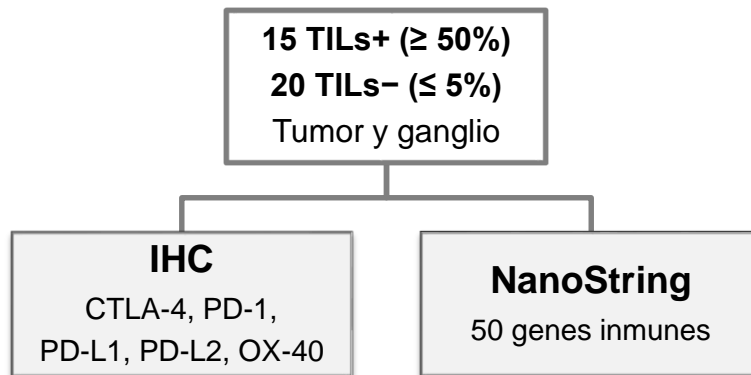
Se trata de un estudio ambispectivo, en el que se usaron muestras de archivo para hacer en ellas diferentes pruebas. Como criterios de inclusión se establecieron que fueran pacientes con CMTN con un tumor de tamaño mayor a 10 mm, sin afectación de ningún ganglio y sin metástasis al diagnóstico. Como criterios de exclusión, las pacientes no debieron haber hecho QT neoadyuvante y debían tener la muestra de la cirugía disponible así como los ganglios linfáticos extraídos en la intervención. El objetivo era seleccionar pacientes con tumores en ambos “extremos”; es decir, con un gran porcentaje de TILs y con mínimo porcentaje de TILs.

A partir de la revisión de 787 informes de anatomía patológica y sus respectivas historias clínicas, se identificaron 102 pacientes T1c/T2 N0 M0 que cumplieran con todos los criterios de inclusión y ninguno de exclusión. Se hizo un proceso de preselección para determinar el porcentaje de TILs en las muestras de tumor. Para ello, se evaluaron todas las TILs totales (sTILs e iTILs) en las láminas teñidas con hematoxilina y eosina (H&E) de la operación, según las últimas guías publicadas por el *International Immuno-Oncology Biomarker Working Group*<sup>33</sup>. Se encontraron 15 pacientes (14,70%) con niveles altos de TILs ( $\geq 50\%$ ) y se eligieron 20 (19,61%) con niveles bajos ( $\leq 5\%$ ) para la formación de los dos grupos, denominados TILs+ y TILs- respectivamente. Se descartaron 6 casos con infiltración linfocitaria muy heterogénea (5,88%). Para la elección del ganglio linfático en pacientes a las que se realizó linfadenectomía o se le extrajeron varios ganglios, se eligió uno de primer nivel que fuera el que tuviera más centros germinales. Todos eran ganglios axilares.

Las muestras estaban comprendidas entre los años 1998 y 2009, ya que a partir del 2010 no se disponía del bloque parafinado de los ganglios, al haberse implantado el sistema OSNA (del inglés *One Step Nucleic Acid Amplification*) en el hospital para el análisis de metástasis ganglionares. Las muestras provinieron del Hospital Vall d’Hebrón de Barcelona y del Hospital Ramón y Cajal de Madrid. Aquellas cuya operación fue posterior a 2007 y no habían fallecido, se las pidió el consentimiento informado para el uso de la muestra en este proyecto, según estableció el comité ético del hospital. Como variables clínicas, se tuvo en cuenta la edad de la paciente al diagnóstico, el tamaño del tumor, la histología y el grado. Todas las muestras estaban conservadas en parafina que habían sido fijadas a formalina 10% tamponada a pH neutro.

## 10. Pruebas

Se planearon dos pruebas: inmunohistoquímica, para la detección de biomarcadores en la superficie celular; y NanoString, para la cuantificación de la expresión génica (ARN) (Figura 26). Ambas pruebas se realizaron tanto en el tumor como en el ganglio de las pacientes.



**Figura 26.** Esquema con las diferentes pruebas proyectadas en nuestro estudio.

### 10.1. Inmunohistoquímica

Se utilizaron cinco anticuerpos para teñir el tumor primario y el ganglio de muestras parafinadas, y además se miró el CD8 en las muestras donde se quería ver la misma zona teñida por diferentes anticuerpos. Las muestras fueron cortadas a un grosor de 4  $\mu\text{m}$  y se usaron los siguientes anticuerpos monoclonales antihumanos: CTLA-4 (clon F-8, dilución 1:75; Santa Cruz Biotechnology), OX-40 (clon H-10, dilución 1:500; Santa Cruz Biotechnology), PD-L2 (clon D7U8C, dilución 1:50, CellSignaling Technology), PD-1 (clon NAT105, prediluido, Ventana), PD-L1 (clon SP263, prediluido, Ventana) y CD8 (clon SP57, prediluido, Ventana)

El PD-L2, CTLA-4 y OX-40 fueron puestos a punto mediante el módulo de tinción Benchmark XT utilizando el kit *UltraView Universal DAB* (Ref: 760-500) de Ventana Medical Systems. El CD8 se ha realizado con el módulo de tinción BenchMark ULTRA utilizando el kit *UltraView Universal DAB* (Ref: 760-500) de Ventana Medical Systems. Los el PD-1 y PD-L1 se han realizado utilizando el módulo de tinción Benchmark XT utilizando el kit *OptiView DAB IHC Detection Kit* (Ref: 760-700) de Ventana Medical Systems. Para el CD8 y PD-L1 se usó además el *OptiView Amplification Kit* para amplificar la señal y así mejorar su lectura.

El desparafinado se realizó mediante la solución EZ prep™ (10x) (Ref. 950-102); la recuperación antigénica con la solución (*Cell Conditioning 1*, (Pre-dilute) (Ref. 950-124); el bloqueo con solución de peróxido de hidrógeno al 3%; y los lavados con el *Reaction Buffer* (10x) (Ref. 950-300). Todos los pasos fueron realizados de manera automática. PD-L2 se incubó durante 44 minutos, el OX-40 36 minutos, el CTLA-4 36 minutos, el CD8 32 minutos, el PD-1 20 minutos y el PD-L1 16 minutos más 8 minutos de amplificación. La Tabla 11 resume las características de los anticuerpos y diferentes reactivos, parámetros y equipos utilizados en la preparación de la muestra.

**Tabla 11.** Resumen de las características los anticuerpos utilizados y de los diferentes reactivos, parámetros y equipos utilizados para su tinción.

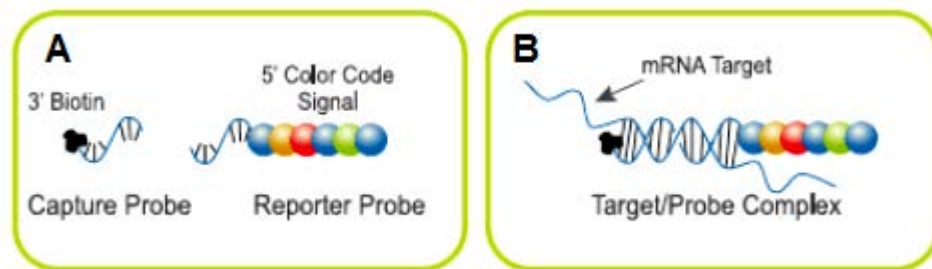
	<b>CTLA-4</b>	<b>OX-40</b>	<b>PD-1</b>	<b>PD-L1</b>	<b>PD-L2</b>	<b>CD8</b>
<b>Clon</b>	F-8	H-10	NAT105	SP263	D7U8C	SP57
<b>Casa comercial</b>	Santa Cruz Biotechnology	Santa Cruz Biotechnology	Roche (Ventana)	Roche (Ventana)	CellSignaling Technology	Roche (Ventana)
<b>Dilución</b>	1/75	1/500	Prediluido	Prediluido	1/50	Prediluido
<b>Módulo</b>	Benchmark XT	Benchmark XT	Benchmark XT	Benchmark XT	Benchmark XT	Benchmark ULTRA
<b>Polímero</b>	UltraView	UltraView	OptiView	OptiView + Amplificación	UltraView	UltraView + Amplificación
<b>Tiempo de incubación</b>	36 min	36 min	20 min	16 min + 8 min	44 min	32 min + 8 min

Dichos marcadores se localizaron mediante el anticuerpo secundario *Horseradish Peroxidase* (HRP) Multimer, el cual contiene un cóctel de anticuerpos marcados con HRP (anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón, de cabra anti-IgM de ratón y de cabra anti-conejo). A continuación, el complejo resultante se visualiza utilizando DAB Chromogen (tetrahidrocloruro de 0,2% 3, 3'-diaminobencidina). Finalmente se realiza una contratinción con Hematoxilina (Ref. 760-2021) y *Bluing Reagent* (Ref. 760-2037). Una vez finalizado el proceso automatizado, las preparaciones se lavan, se deshidratan y se procede a su montaje siguiendo el proceso habitual.

Los anticuerpos fueron evaluados de manera independiente por dos investigadores (AQ y VP), teniendo en cuenta el porcentaje de células positivas y la intensidad. En varios anticuerpos se valoró por separado la tinción en diferentes estructuras o tipos de células según las hipótesis establecidas. Cuando había alguna discrepancia importante entre los dos evaluadores, se discutieron los casos con un microscopio de doble cabezal hasta llegar a un acuerdo en la valoración.

## 10.2. Panel de expresión de genes

La técnica de NanoString nos permite detectar de una manera muy sensitiva y reproducible la expresión génica de una muestra biológica. Gracias a los *barcodes* con los que se le marca las diferentes moléculas de ARNm (ácido ribonucleico mensajero), podemos hacer un recuento absoluto de éstas sin tener que hacer ningún paso de transcripción inversa o amplificación (Figura 27). Cada *barcode* está formado de 6 bolas que pueden ser de cuatro colores diferentes, por lo que según el orden de colores se forma un código único para cada ARNm.



**Figura 27.** Moléculas utilizadas en la técnica de NanoString. A) El *Capture Probe* nos sirve para enlazar el ARNm, a través de la biotina, a bolas magnéticas de la placa para que el complejo no se eluya en los diferentes lavados; y el *Reporter probe* nos marca cada ARNm con una secuencia de colores para su identificación posterior. B) Estructura del complejo *Capture-Reporter-ARNm*. Los *probes* son específicos para cada ARNm<sup>85</sup>.

El *Capture Probe* y *Reporter Probe* se añaden en exceso para asegurarnos de que todo el ARNm de la muestra que se quiere detectar ha sido hibridado. Después el exceso de *probes* y el ARNm que no es de interés se elimina en dos pasos, donde primero se hace una fijación de los complejos a estudiar en bolas magnéticas de la placa a través del *Capture probe* para poder lavar los ARNm que no nos interesan. Luego se añaden los *Reporter probes* y se vuelve a hacer un lavado para eliminar el exceso de *probes* para no contar moléculas de más. Una vez que se tiene en el complejo solo en la reacción, se procede a su visualización y contaje.

### Preparación de las muestras

El ARN de las muestras se extrajo con el *Maxwell® 16 LEV RNA FFPE kit* (Promega)<sup>86</sup>, habiéndose previamente cortado en rollitos los bloques de parafina y dispuestos en un tubo eppendorf.

Para la preparación de la técnica, se hicieron los siguientes pasos, según el protocolo *nCounter XT CodeSet Gene Expression*<sup>85</sup>:

1. Se sacaron los tubos del *Reporter ProbeSet* y del *Capture ProbeSet* del congelador y se dejaron a temperatura ambiente para su descongelación. Se invirtieron varias veces para mezclar el contenido y se centrifugaron ambos los reactivos.
2. Se creó la mezcla maestra añadiendo 5  $\mu\text{L}$ /muestra del buffer de hibridación a 3  $\mu\text{L}$ /muestra del *Reporter CodeSet*. Se invirtieron repetidamente y se centrifugó.
3. Se puso 8  $\mu\text{L}$  de la mezcla maestra en cada tubo etiquetado y después se añadió 5  $\mu\text{L}$  de ARN de cada paciente (25-100 ng). En algunos casos se añadió agua libre de ARNasas para que el volumen total fuera 13  $\mu\text{L}$ .
4. Se invirtió las alícuotas del *Capture ProbeSet* para mezclar su contenido y se centrifugó. Se añadió 2  $\mu\text{L}$  de la alícuota de *Capture ProbeSet* a cada tubo. Los tubos se invirtieron varias veces para asegurarse que estaban bien mezclados y se pusieron inmediatamente a 65°C en el termociclador (previamente calentado)
5. Las muestras se incubaron unas 16h en el termociclador, y se recogieron a 4°C dentro de las 24h posteriores.

#### Diseño del panel de genes inmunes

Se decidió por el diseño de un *codeset* de NanoString personalizado, en el que se eligieron 50 genes inmunes, clasificados en tres grupos: receptores de membrana y sus ligandos, marcadores de tipo de célula inmune y moléculas liberadas al microambiente tumoral. Aquellos cuya expresión es antitumoral o proinflamatoria están marcados en verde, los que son protumorales o antiinflamatorios están puestos en rojo, y los que su función es ambigua o se une a diferentes tipos de marcadores se ha marcado en amarillo. El panel contaba también con 10 *housekeeping genes* o genes de control, que nos aseguran que la técnica se ha desarrollado correctamente (Tabla 12).

**Tabla 12.** Panel personalizado de 50 genes diseñado para el estudio de las muestras en la plataforma NanoString. En rojo están marcados aquellos genes relacionados con la progresión del tumor (antiinflamatorios), en verde los que favorecen la supresión del tumor (proinflamatorios), y en amarillo los que su presencia es ambigua o con doble función.

<b>RECEPTORES DE MEMBRANA Y SUS LIGANDOS</b>	
CTLA-4	CD152 – Marcador de inactivación temprano de linfocitos T citotóxicos (se une a CD80 y CD86)
CD28	Marcador de activación de linfocitos T (se une a CD80 y CD86 con menor afinidad que CTLA-4)
CD80	B7.1 – Presente en las CPA (se une a CTLA-4 y a CD28)
CD86	B7.2 – Presente en las CPA (se une a CTLA-4 y a CD28)
PD-1	CD279 – Marcador de inactivación tardío en células T citotóxicas
PD-L1	CD274, B7-H1 – Marcador de desactivación presente en el tumor y CPA
PD-L2	CD273 – Marcador de desactivación presente en CPA especialmente, y en tumor
OX40	CD134 – Marcador de activación tardío de los linfocitos T, especialmente Th
CD252	OX40L – Presente en CPA
LAG-3	CD223 – Marcador de inactivación de linfocitos T
TIM-3	Marcador de inactivación de linfocitos T citotóxicos tardío (después del PD-1)
GAL9	Ligando de TIM-3 presente en células tumorales y CPA
CXCR3	Receptor de citoquinas expresado en células Th1 activadas y células NK
TIGIT	Marcador de inactivación de linfocitos T citotóxicos y células NK
BTLA	CD272 – Marcador inhibición de linfocitos B y Th1 (se une a la familia B7 y TNF)
CD40	Presente en CPA y linfocitos B, activa linfocitos Th
CD154	CD40L– presente en linfocitos Th activados
CD278	ICOS – Marcador de co-estimulación tardío de los linfocitos T
CD275	ICOSL , B7-H2 – Presente en CPA y linfocitos B
CD137	4-1BB – Presente en linfocitos T activados, sobre todo los citotóxicos
CD27	Marcador de mantenimiento a largo plazo de la activación de linfocitos T
CD70	CD27L - Induce proliferación de linfocitos T y B activados
CD30	Marcador presente en linfocitos T y B activados
CD153	CD30L – Marcador presente en linfocitos B y T activados, también en macrófagos
CD276	B7-H3 – Inhibición de los linfocitos T
B7-H4	Presente en CPA, inhibe los linfocitos T citotóxicos por un marcador desconocido
CD103	Presente en linfocitos T citotóxicos, favorece la adhesión a células epiteliales
GITR	Activación de células T, inhibición de las células T reguladoras
CD39	Enzima ectonucleotidasa de superficie celular, crea un microambiente antiinflamatorio
CD73	Enzima ectonucleotidasa de superficie celular, crea un microambiente antiinflamatorio
<b>MARCADORES DE TIPO DE CÉLULA INMUNE</b>	
CD8A	Marcador de identificación de linfocitos T citotóxicos
CD4	Marcador de identificación de linfocitos T ayudantes
CD3D	Marcador de identificación de linfocitos T
CD25	Marcador de identificación de linfocitos T reguladores
FOX-P3	Marcador de identificación de linfocitos T reguladores



CD68	Marcador de identificación de macrófagos			
CD20	Marcador de identificación de linfocitos B vírgenes			
CD21	Marcador de identificación de linfocitos B activados			
CD56	Marcador de identificación de células NK			
CD11b	Marcador de identificación de MDSCs			
CD45RO	Marcador de identificación de linfocitos T de memoria			
CD1a	Marcador de identificación de células dendríticas vírgenes			
CD83	Marcador de identificación de células dendríticas maduras			
<b>MOLÉCULAS LIBERADAS AL MICROAMBIENTE TUMORAL</b>				
IL-2	Promueve la proliferación de células T			
IL-10	Promueve la aparición de Th2, favoreciendo la progresión del tumor			
IFN- $\gamma$	Favorece la supresión del tumor (Th1)			
TNF- $\alpha$	Favorece la supresión del tumor a través del Th1 y del sistema innato			
TGF- $\beta$	Favorece la supresión de la respuesta inmune liberado por Treg o Th17			
VEGF-A	Factor de crecimiento endotelial, favorece el crecimiento del tumor			
IDO	Enzima que favorece un ambiente antiinflamatorio			
<b>GENES DE CONTROL DE LA TÉCNICA</b>				
CHMP2A exon 1	EMC7 exon 3	GAPDH E1-E2-E3	GPI exon 6	POLR2A E20-21
CHMP2A exon 2	EMC7 exon 5	GPI exon 4	OAZ1 E2-E3	SF3A1

Ir al listado de abreviaturas para el significado de cada gen o de las abreviaturas

## 11. Análisis estadístico

Los biomarcadores evaluados por la técnica de inmunohistoquímica se valoran según el porcentaje de tinción respecto a la superficie total de la muestra o de la región a evaluar. Las variables continuas son representadas a partir de su mediana y desviación estándar, mientras que las categóricas a partir del valor absoluto y su porcentaje. Se utilizan métodos no-paramétricos para el análisis de expresiones después de rechazar la hipótesis de normalidad a partir del test de Shapiro-Wilk. El test U de Mann-Whitney se utiliza para las comparaciones entre los dos grupos de estudio y se reporta el p-valor obtenido juntamente con la mediana y el rango de cada grupo. El análisis estadístico se ha realizado mediante el software R versión 3.5.1.

Para la técnica de NanoString se usaron dos tests: el ANOVA y el SAM. La asociación entre dos variables se evaluó usando el test t de Student y Pearson's  $\chi^2$  o ANOVA. Para identificar genes cuya expresión era diferente significativamente entre las parejas tumor-ganglio, se usó un test de dos clases pareadas SAM (del inglés, *significance of microarrays*) con FDR (del inglés *false discovery rate*) <5%, y análisis no pareados entre las pacientes con altos y bajos niveles de TILs de cada grupo. Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el software R versión 3.5.1.

# RESULTADOS

---

## RESULTADOS

En total se incluyeron 35 pacientes en el estudio, 15 pacientes con TILs altos (TILs+,  $\geq 50\%$  de infiltración linfocitaria) y 20 pacientes con TILs bajos (TILs-,  $\leq 5\%$ ). Se prefirió tener una n más alta a que los dos grupos tuvieran el mismo número de muestras. El rango de infiltración linfocitaria de las pacientes TILs+ fue de 55% a 90% y los de TILs- de 0% a 5%. La Tabla 13 muestra las diferentes variables clínicas e histopatológicas de las pacientes de cada grupo.

**Tabla 13.** Variables clínicas e histopatológicas de las pacientes del estudio, según la presencia o no de *Tumor Infiltrating Lymphocytes*.

	<b>TILs+ (<math>\geq 50\%</math>) 15 pacientes</b>	<b>TILs- (<math>\leq 5\%</math>) 20 pacientes</b>
<b>Edad diagnóstico (años)</b>		
- Media	55	61
- Mediana	56	62
- Rango	26 – 79	38 – 79
<b>Tipo de operación</b>		
- Tumorectomía (%)	9 (60%)	16 (80%)
- Mastectomía (%)	6 (40%)	4 (20%)
<b>Tamaño tumor (mm)</b>		
- Media	22,47	20,05
- Mediana	22	18
- Rango	11 – 50	11 – 35
<b>Estadio tumor (%)</b>		
- T1cN0M0	6 (40%)	12 (60%)
- T2N0M0	9 (60%)	8 (40%)
<b>Histología (%)</b>		
- Ductal infiltrante	12 (80%)	15 (75%)
• G2	• 0	• 1
• G3	• 12	• 14
- Medular G3	3 (20%)	0 (0%)
- Metaplásico G3	0 (0%)	2 (10%)
- Mucinoso	0 (0%)	1 (5%)
- Lobulillar G2	0 (0%)	1 (5%)
- Indiferenciado G3	0 (0%)	1 (5%)
<b>Extirpación ganglios linfáticos (%)</b>		
- Linfadenectomía	9 (60%)	5 (25%)
- Selección ganglio/s centinela/s	6 (40%)	15 (75%)

G2: grado 2; G3 grado 3; TILs: del inglés *Tumor Infiltrating Lymphocytes*

## 12. Inmunohistoquímica de los receptores inmunes

Se evaluó el porcentaje de tinción en el tumor y el ganglio por diferentes zonas y tipos de células, acorde con el tipo de tinción del marcador en cuestión. En el caso de los centros germinales, cuando no estaban presentes no se incluían en la comparación, para distinguir aquellos ganglios que tenían centros sin teñir, valorados como 0%. Para evaluar los anticuerpos PD-L2 y CTLA-4, se usó el programa *cellSens Entry* de Olympus, ya que las tinciones eran débiles y este programa permitía aumentar el contraste del fondo blanco con la tinción marrón. Fue el mismo programa que se usó para tomar las fotografías de todos los anticuerpos. La Tabla 14 muestra un resumen de los resultados de la mediana y el rango de las valoraciones, y la significación estadística de cada comparación.

**Tabla 14.** Resumen de los resultados de las comparaciones entre pacientes TILs- y TILs+ por anticuerpo y por zonas y tipo celular, expresado en mediana, rango y el valor p.

Anticuerpo	Zona	Mediana	Rango	Valor p
<b>Ganglio linfático</b>	CTLA-4 (linfocitos) • TILs- • TILs+	7% 4%	2.0% - 12% 0.5% - 9%	<b>p = 0.01</b>
	PD-1 (linfocitos) • TILs- • TILs+	15% 15%	3% - 50% 3% - 30%	p = 0.89
	PD-L1 • TILs- • TILs+	10% 7%	1% - 40% 1% - 25%	p = 0.29
	PD-L2 • TILs- • TILs+	3% 1%	0% - 10% 0% - 10%	p = 0.11
	OX-40 • TILs- • TILs+	30% 15%	5% - 100% 1% - 30%	<b>p = 0.01</b>
<b>Centro Germinal*</b>	CTLA-4 • TILs- • TILs+	10% 6%	0% - 15% 2% - 15%	p = 0.44
	PD-1 • TILs- • TILs+	60% 50%	30% - 90% 30% - 80%	p = 0.30
	PD-L1 • TILs- • TILs+	5% 7%	0% - 20% 0% - 50%	p = 0.28
	PD-L2 • TILs- • TILs+	0% 2%	0% - 10% 0% - 20%	<b>p = 0.03</b>
	OX-40 • TILs- • TILs+	90% 65%	50% - 100% 2% - 90%	<b>p = 0.01</b>
<b>Tumor (células tumorales)</b>	PD-L1 • TILs- • TILs+	0.0% 0.5%	0% - 0.5% 0% - 5.0%	<b>p &lt; 0.001</b>
	OX-40 • TILs- • TILs+	35% 15%	5% - 100% 0% - 50%	<b>p &lt; 0.01</b>

\*Si la muestra de ganglio no tenía ningún centro germinal, no se incluía en la comparación de estas estructuras, para distinguir aquellos centros germinales con tinción 0%.

TILs: del inglés *Tumor Infiltrating Lymphocytes*

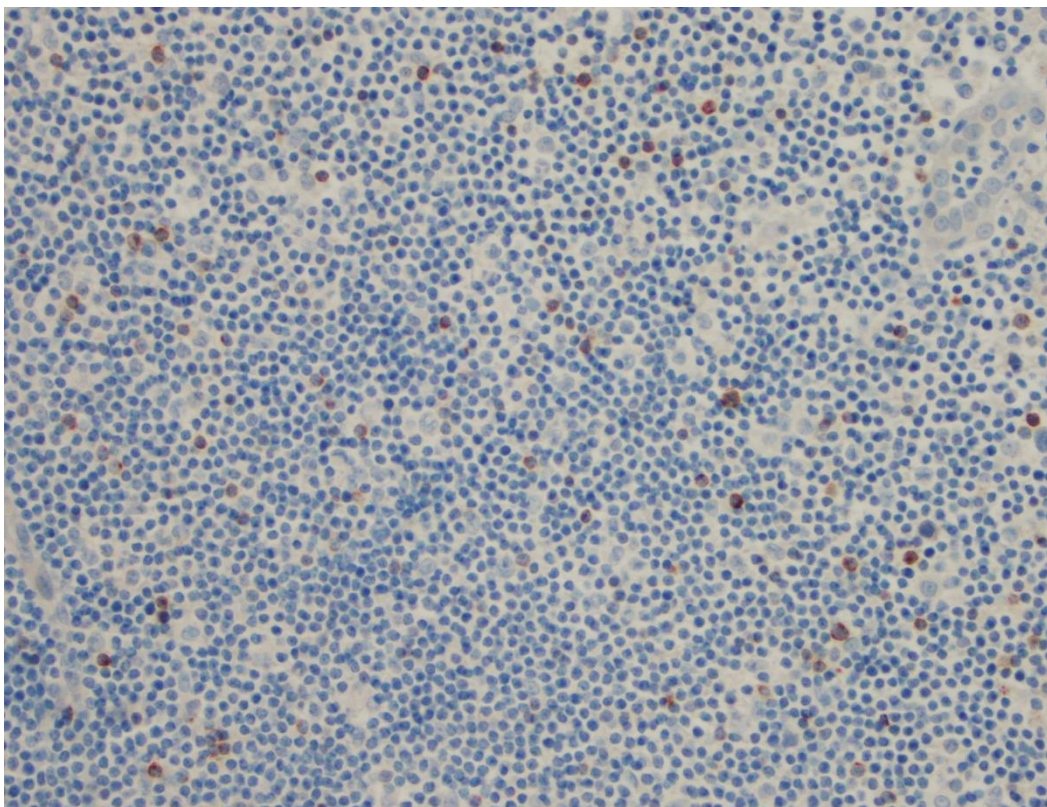
## 12.1. Descripción de la tinción de los anticuerpos

Se hizo un análisis cualitativo detallado de la tinción de los cinco anticuerpos utilizados para comprender qué células y estructuras se teñían.

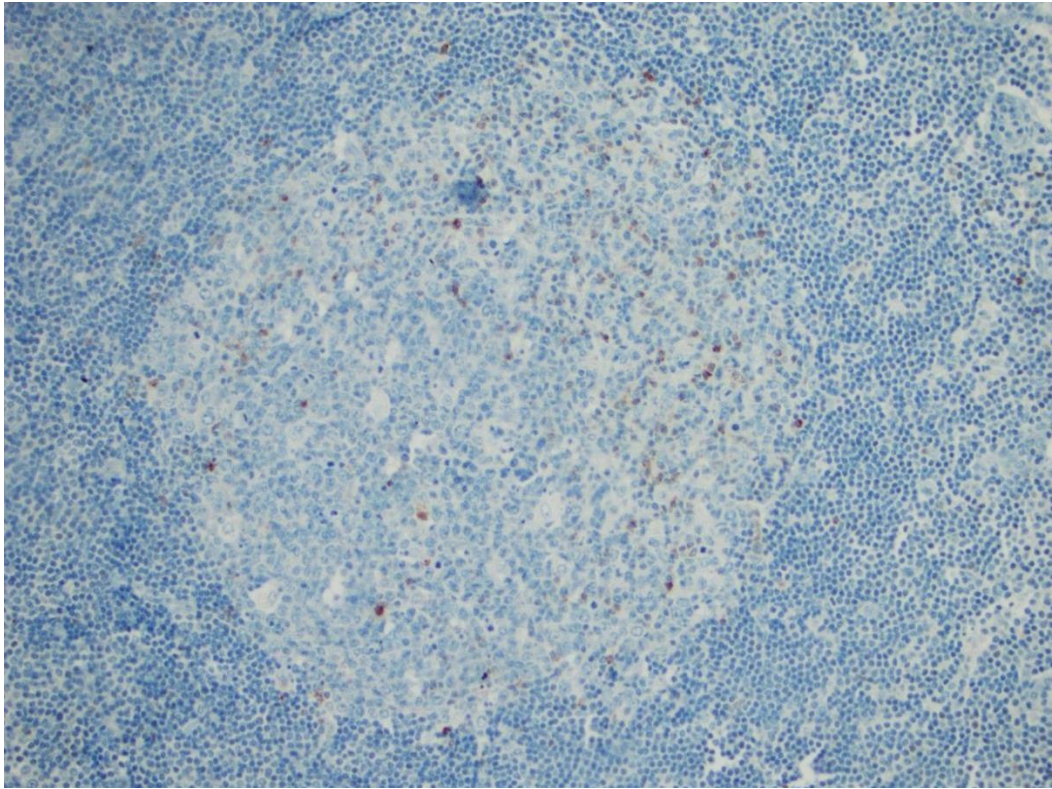
### 12.1.1. Tinción de CTLA-4

En los ganglios, el CTLA-4 tiñe los linfocitos del área paracortical (Foto 1) y del centro germinal (Foto 2). También se observa tinción citoplasmática de los macrófagos de los senos medulares y la médula (Foto 3). Se valora por separado por linfocitos (tinción puntiforme/de membrana, presentes en la zona paracortical) de los macrófagos (tinción citoplasmática, presentes en los senos medulares y médula) ya que la tinción es diferente y en regiones diferentes del ganglio. Se compara solo la tinción de los linfocitos para testar la hipótesis principal. En los ganglios también se observó una tinción granular en casi la mitad de las muestras de ganglio (la mayoría en los ganglios de TILs-), que no se tuvo en cuenta en la valoración (Foto 4)

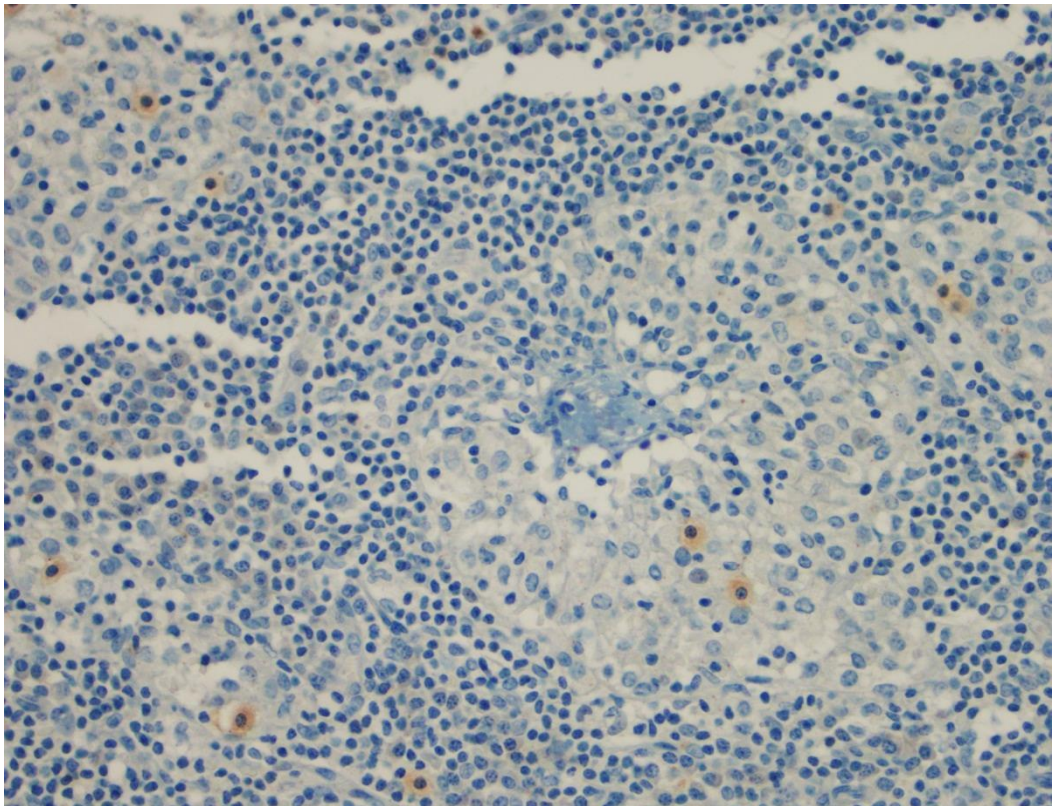
En el tumor, el CTLA-4 tiñe las TILs (Foto 5) y los linfocitos de los TLS (Foto 6), por lo que no se puede hacer comparación entre las células tumorales de las pacientes TILs+.



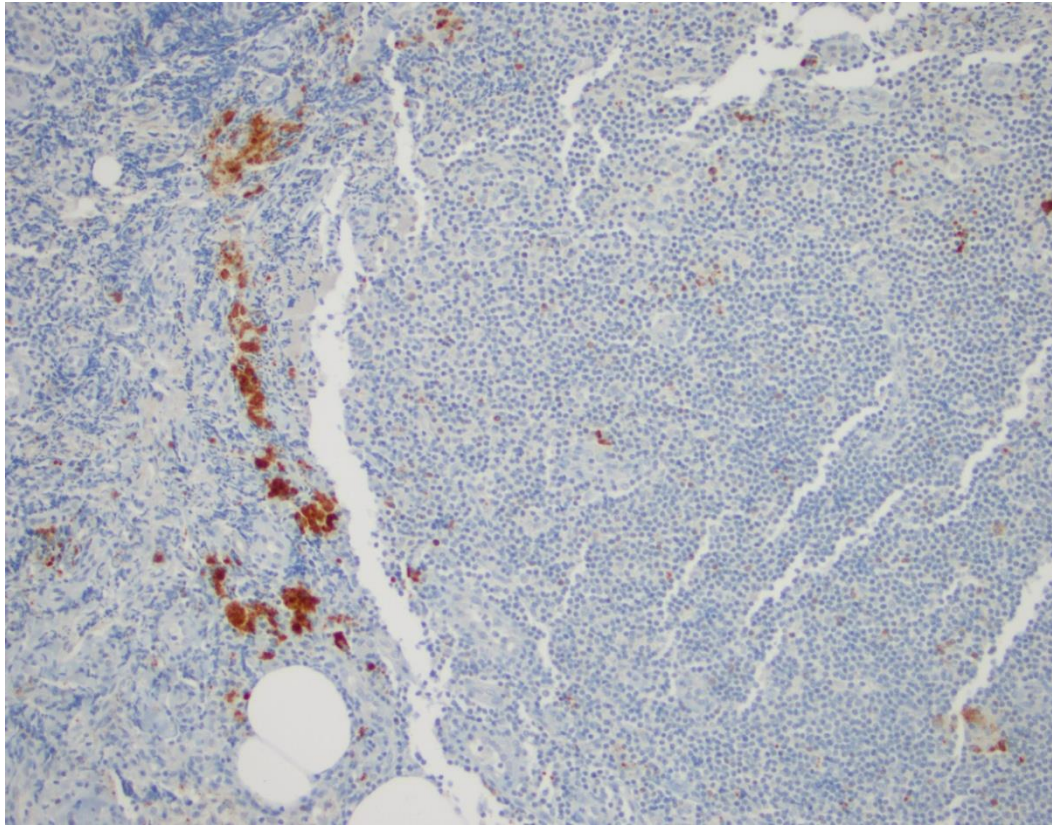
**Foto 1.** Tinción de CTLA-4 en los linfocitos en el área paracortical del ganglio linfático (40x).



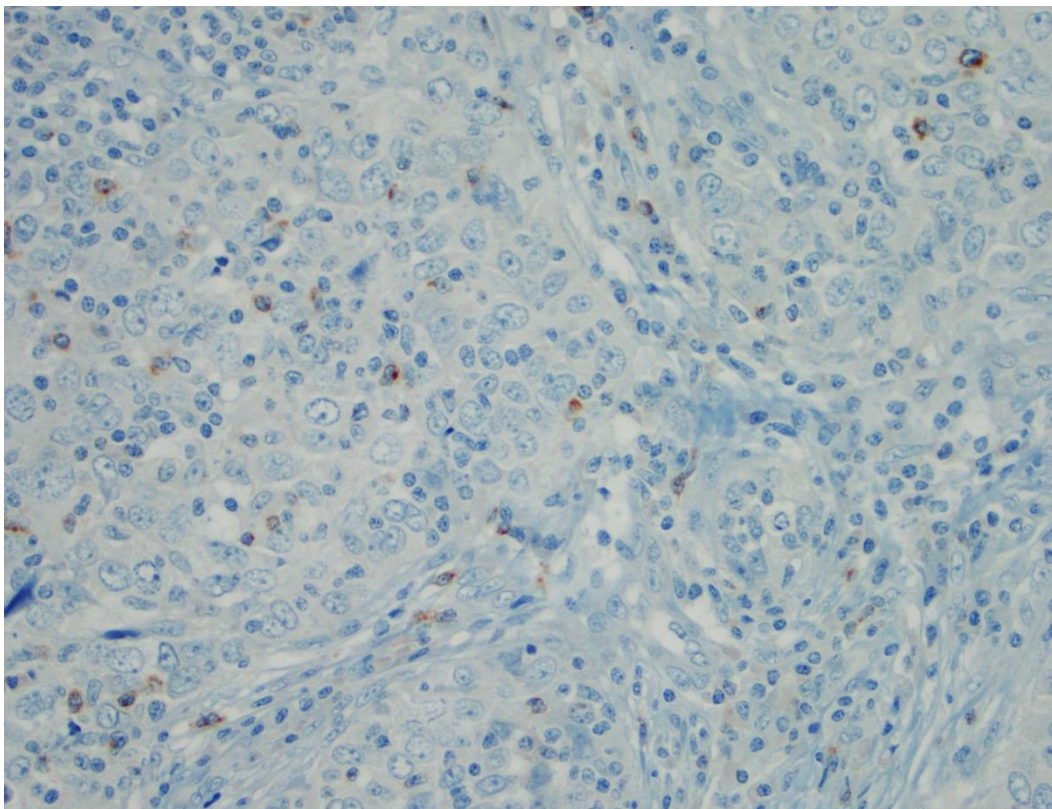
**Foto 2.** Tinción de CTLA-4 del centro germinal del ganglio linfático (20x).



**Foto 3.** Tinción de CTLA-4 citoplasmático en macrófagos de la medula del ganglio linfático (40x).

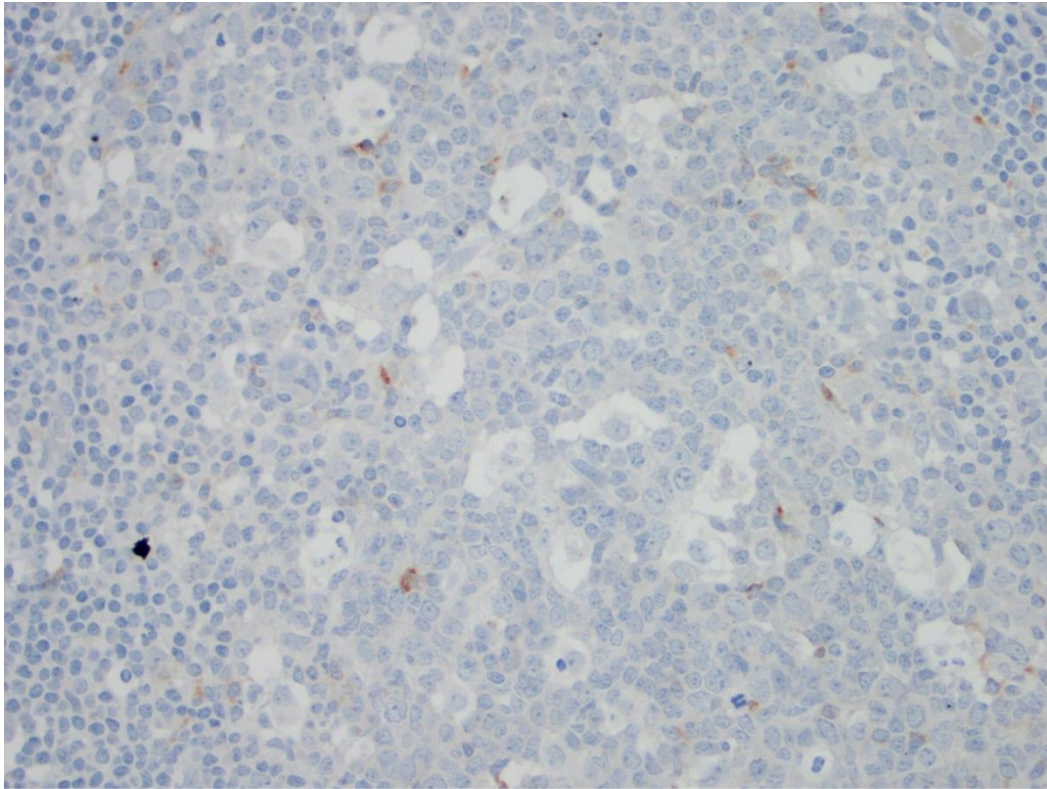


**Foto 4.** Tinción de CTLA-4 granular en el área paracortical (20x)



**Foto 5.** Tinción de CTLA-4 de las iTILs (40x).  
TILs: del inglés *Tumor Infiltrating Lymphocytes*.



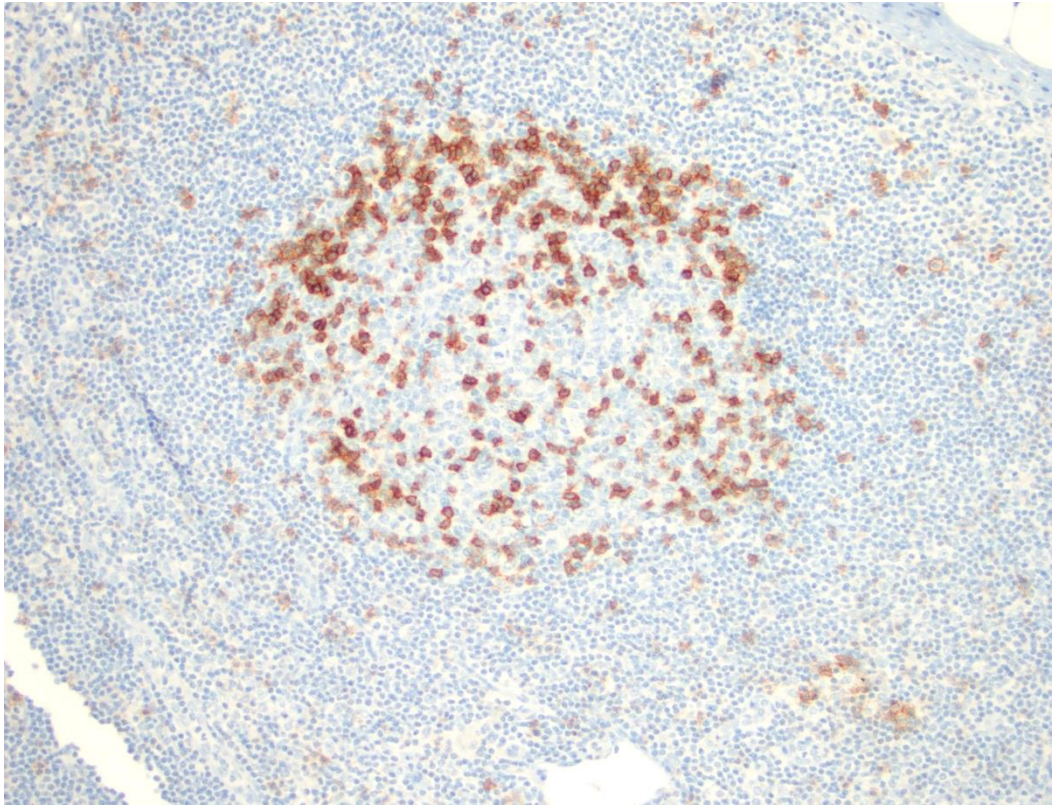


**Foto 6.** Tinción de CTLA-4 en los linfocitos de un TLS (40x).  
TLS: del inglés *Tertiary Lymphoid Structure*.

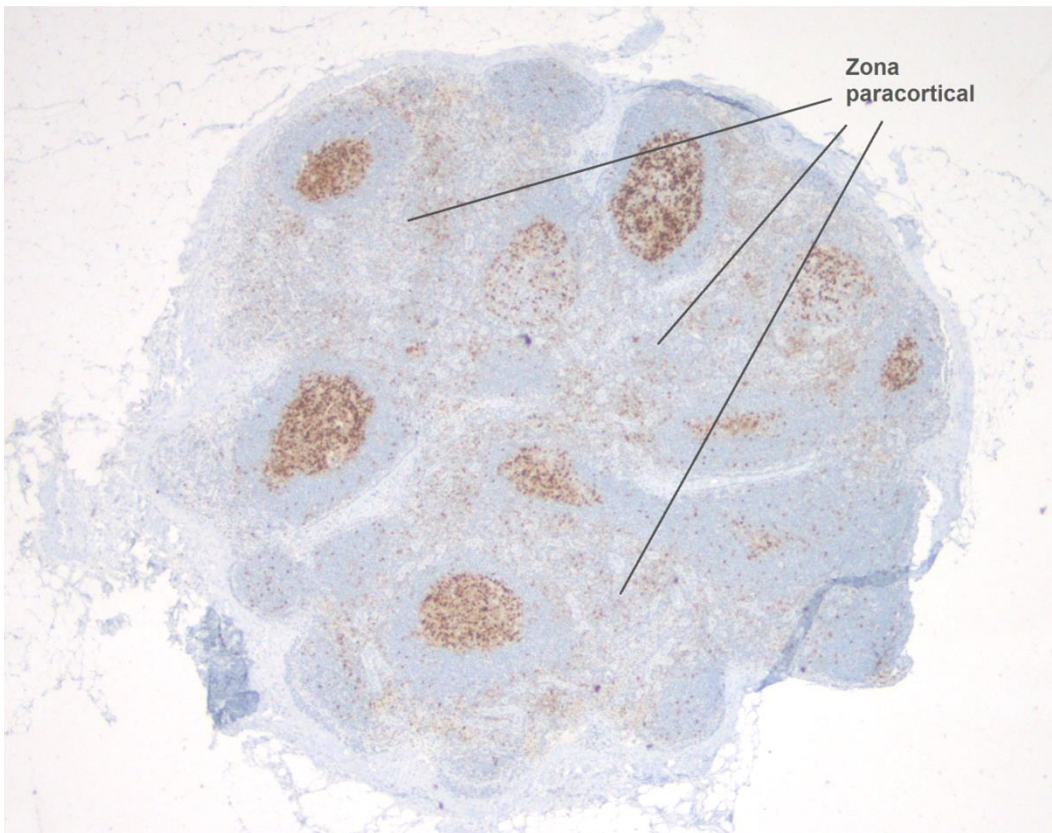
### 12.1.2. Tinción de PD-1

En el ganglio, tiñe básicamente la membrana de los linfocitos de varias zonas, no se aprecian tinciones de macrófagos u otras células. Se observan tinciones en: los centros germinales y el manto (Foto 7); la zona paracortical (Foto 8) y los folículos primarios (Foto 9). Se valora por separado la tinción de los centros germinales (excluyendo el manto) del resto del ganglio para la comparación.

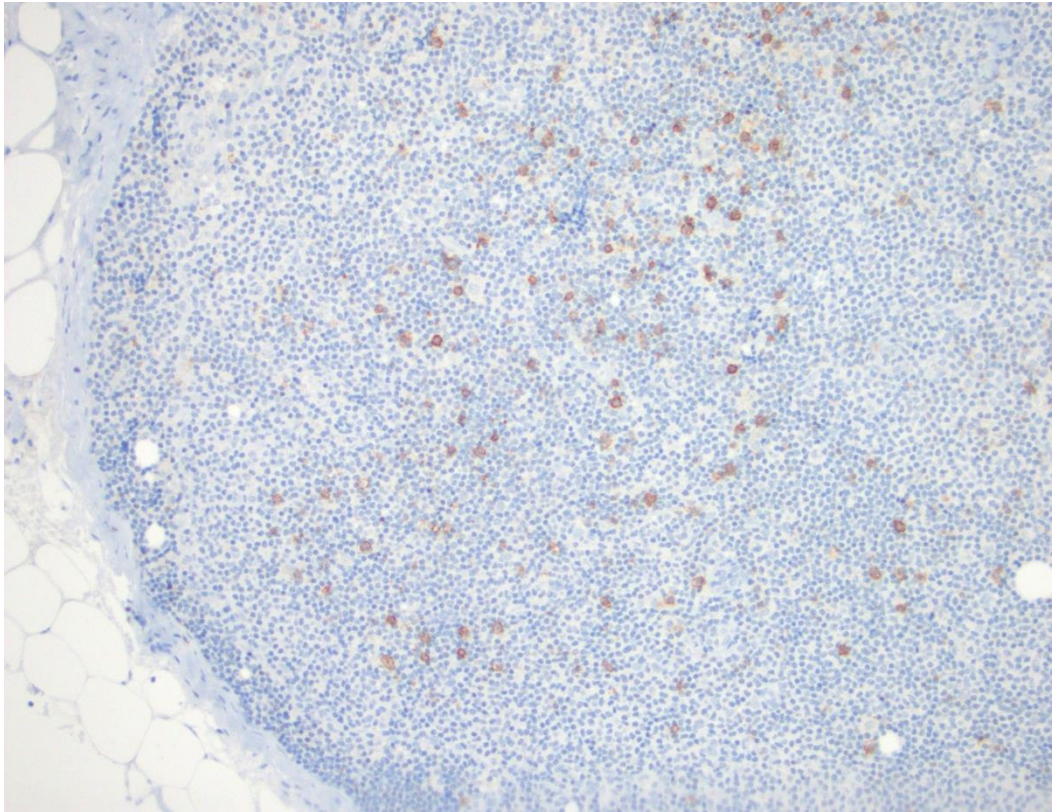
En el tumor, solo tiñe las TILs (Foto 10) y los TLS (Foto 11), por lo que no se ha hecho comparativa de las células tumorales entre los dos grupos de pacientes. La tinción es de membrana y a veces puede llegar a ser muy intensa (Foto 12).



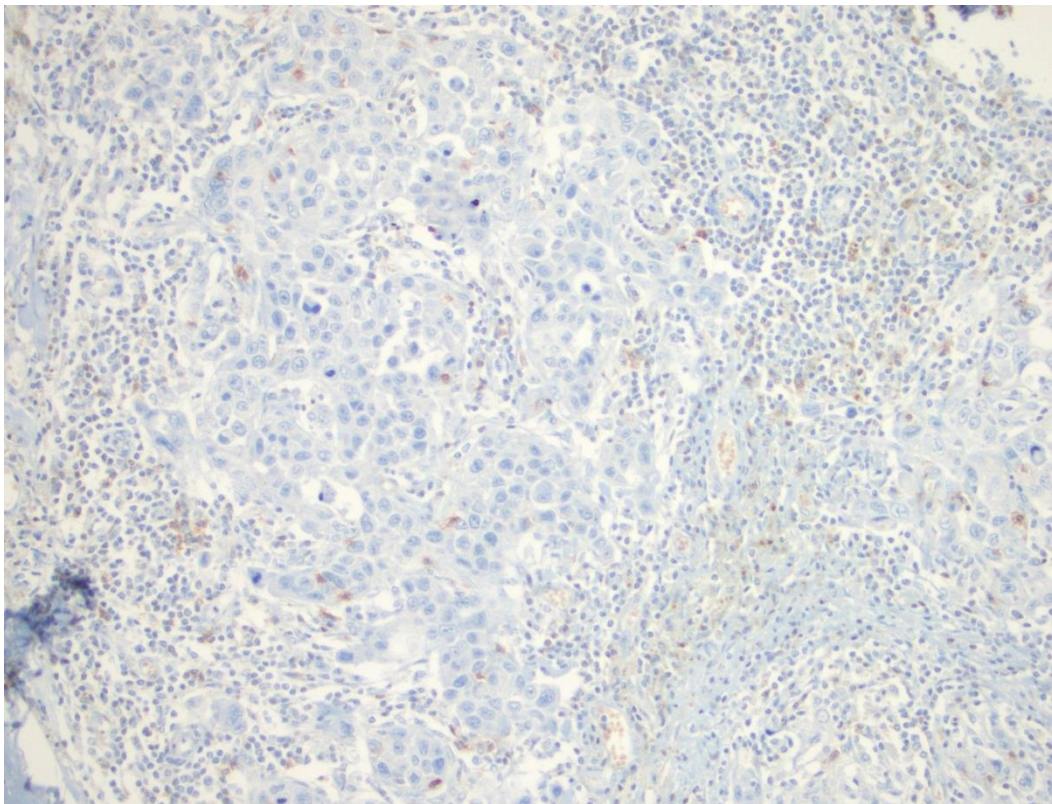
**Foto 7.** Tinción de PD-1 en centro germinal y manto (20x).



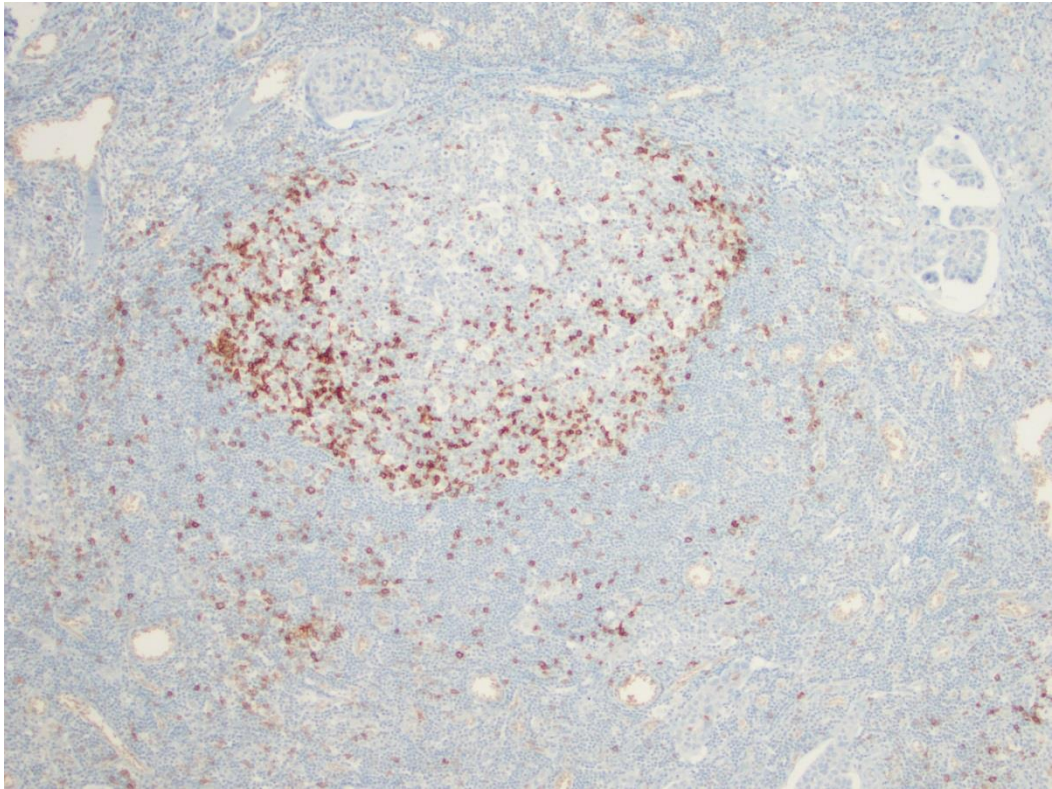
**Foto 8.** Tinción de PD-1 de un ganglio completo, donde se ha señalado el área paracortical (4x).



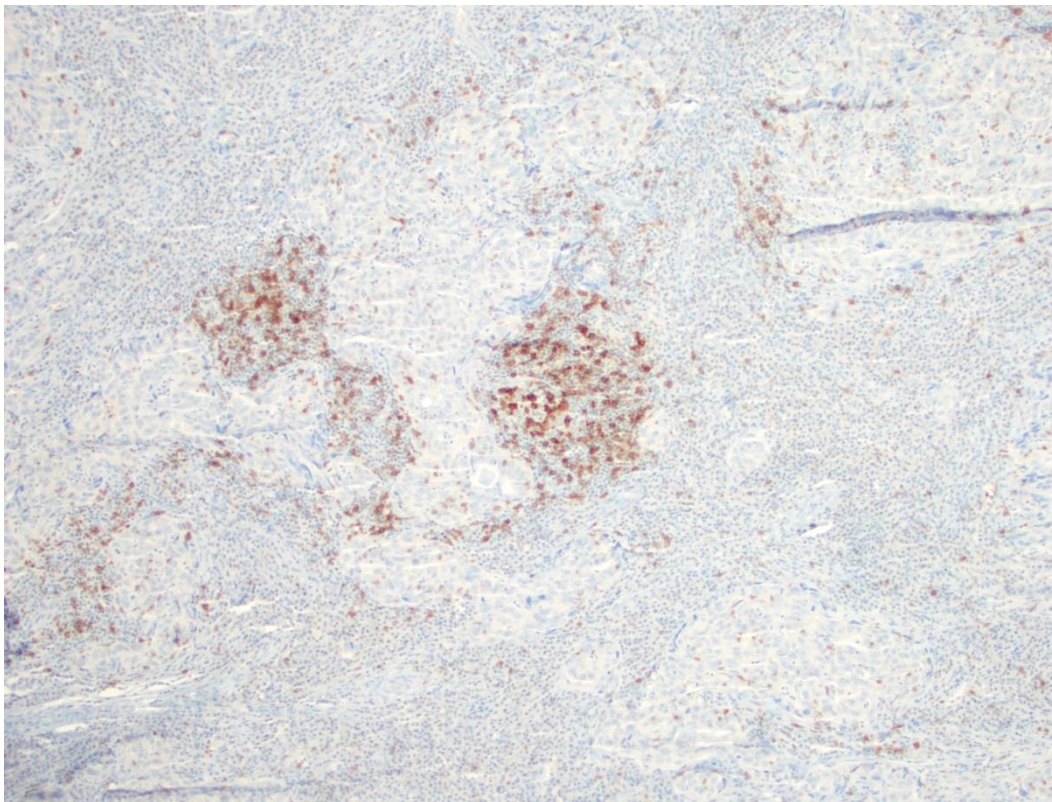
**Foto 9.** Tinción de PD-1 en un folículo primario (20x).



**Foto 10.** Tinción de PD-1 en las TILs estromales e intratumorales (20x).  
TILs: del inglés *Tumor Infiltrating Lymphocytes*.



**Foto 11.** Tinción de PD-1 de un TLS dentro del área tumoral en una paciente TILs+ (10x). TLS: del inglés *Tertiary Lymphoid Structure*, TILs: del inglés *Tumor Infiltrating Lymphocytes*.

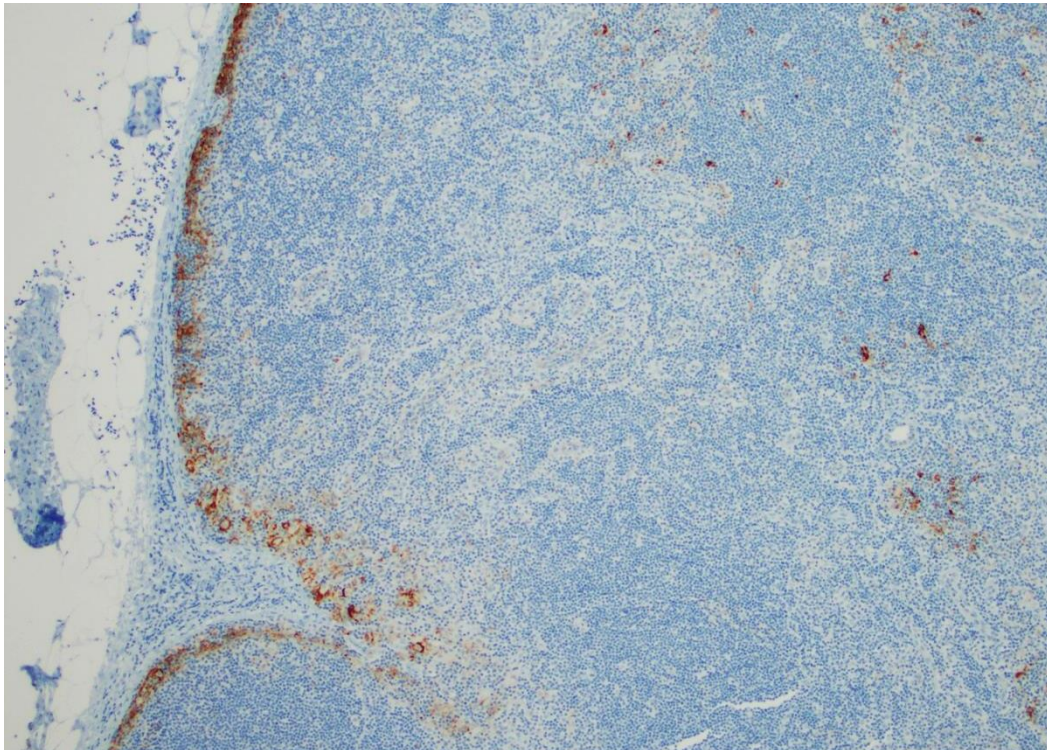


**Foto 12.** Tinción de PD-1 intensa de las TILs concentrada en una zona concreta a los lados de un nido tumoral (10x). TILs: del inglés *Tumor Infiltrating Lymphocytes*

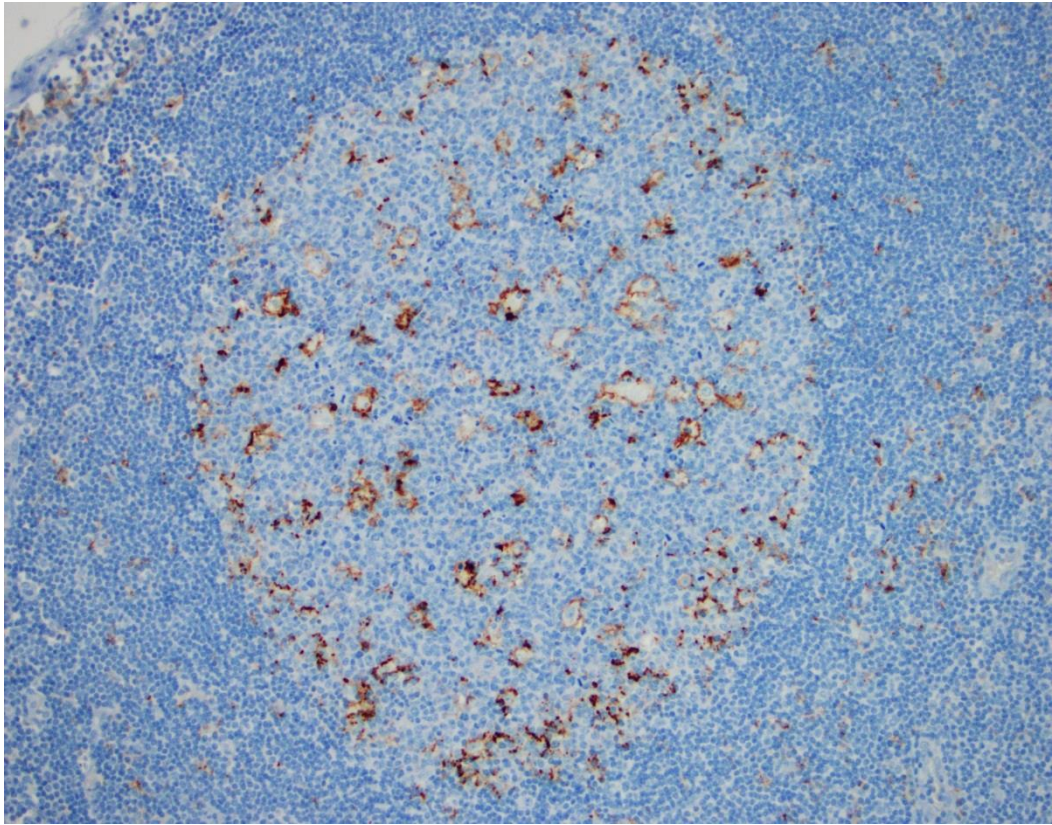
### 12.1.3. Tinción de PD-L1

En los ganglios, varias células presentan tinción de membrana o puntiforme en diferentes zonas: macrófagos y linfocitos del seno subcapsular (Foto 13); los macrófagos de los centros germinales (Foto 14); probablemente solo las células dendríticas de la zona paracortical (Foto 15 y Foto 16); y los macrófagos de los senos medulares (Foto 17). Se valora por separado la tinción de los CG del resto del ganglio. No es posible valorar las diferentes zonas por separado al ser la tinción difusa y en varias células, y además no en todos los ganglios es posible distinguir cual son folículos y cuál es el paracórtex.

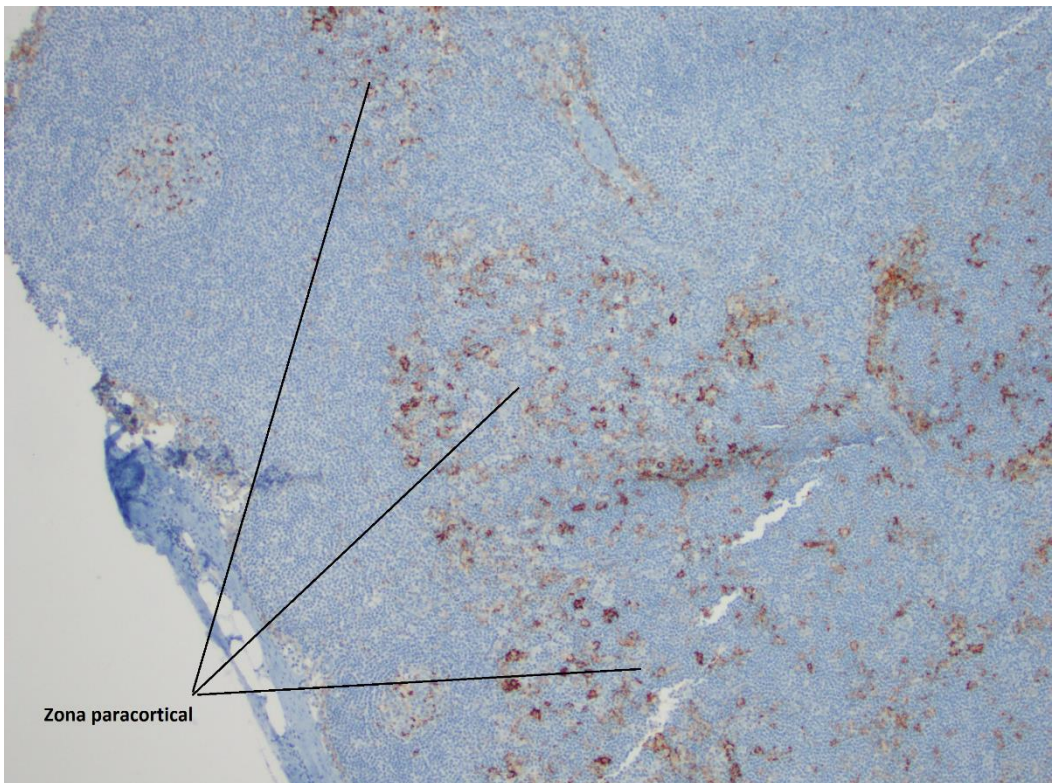
En el tumor, el PD-L1 es un anticuerpo difícil de valorar –especialmente en las muestras de TILs+– porque tiñe tanto las células tumorales (Foto 18) como las células del sistema inmune (Foto 19). Esto es especialmente difícil si la paciente tiene muchas TILs intratumorales que también están teñidas (Foto 20). Además, muchas veces las células tumorales se pueden confundir con macrófagos debido a que tienen un tamaño similar y la tinción es muy parecida (Foto 21). También tiñe los macrófagos del TLS (Foto 22).



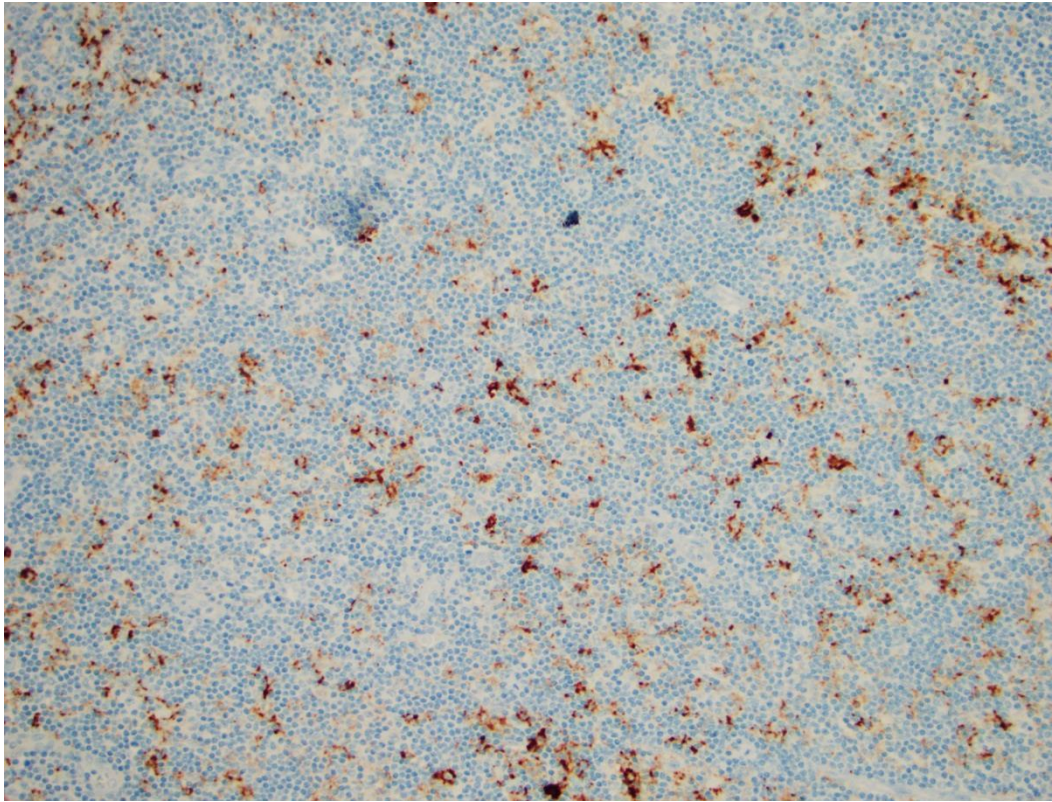
**Foto 13.** Tinción de PD-L1 del seno subcapsular de un ganglio linfático (10x).



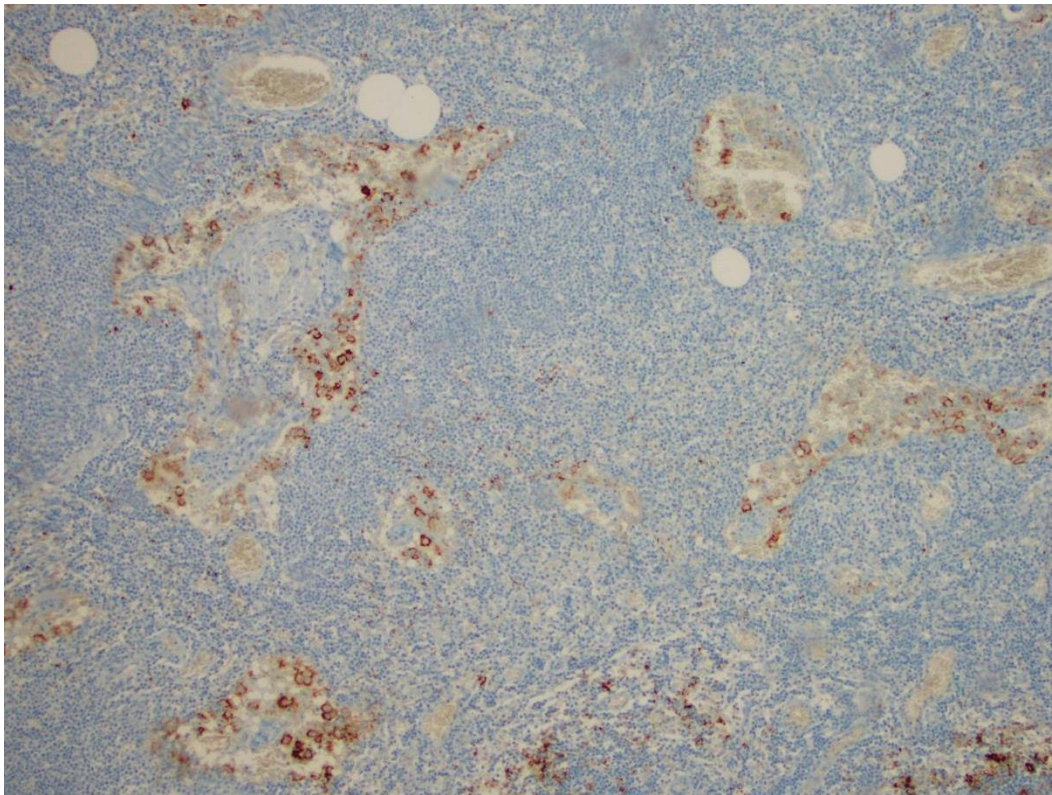
**Foto 14.** Tinción de PD-L1 en los macrófagos de un centro germinal (40x).



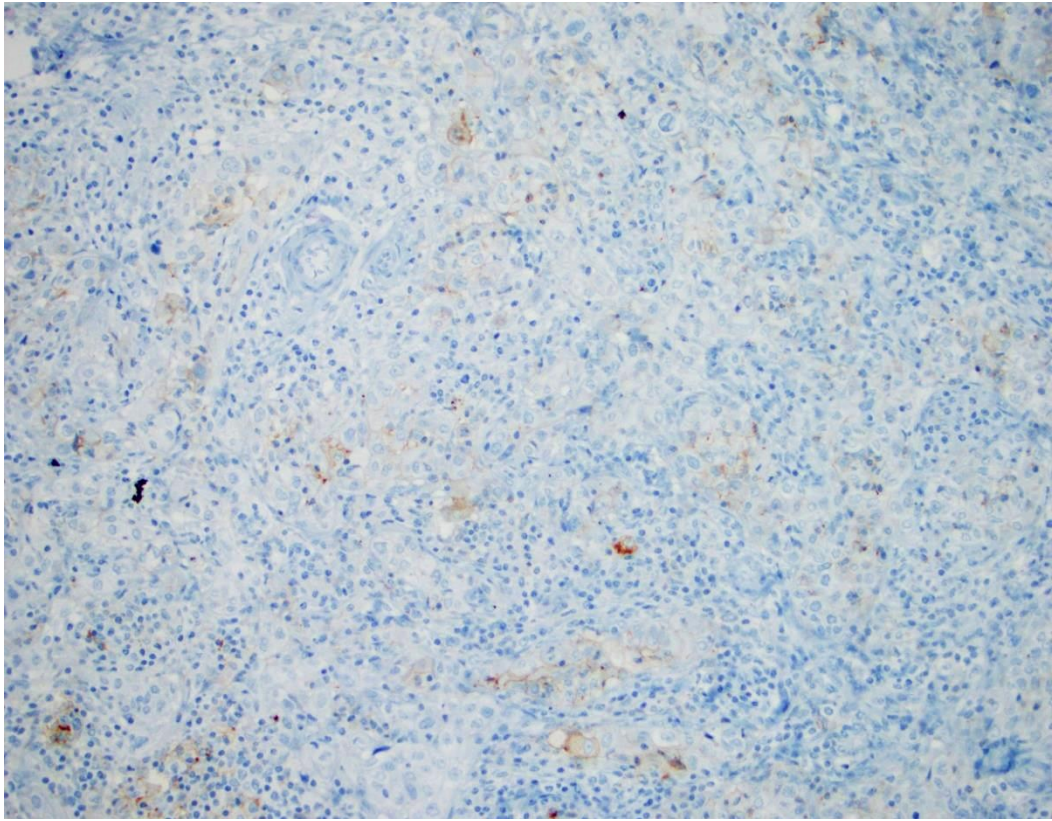
**Foto 15.** Tinción de PD-L1 en el área paracortical (10x).



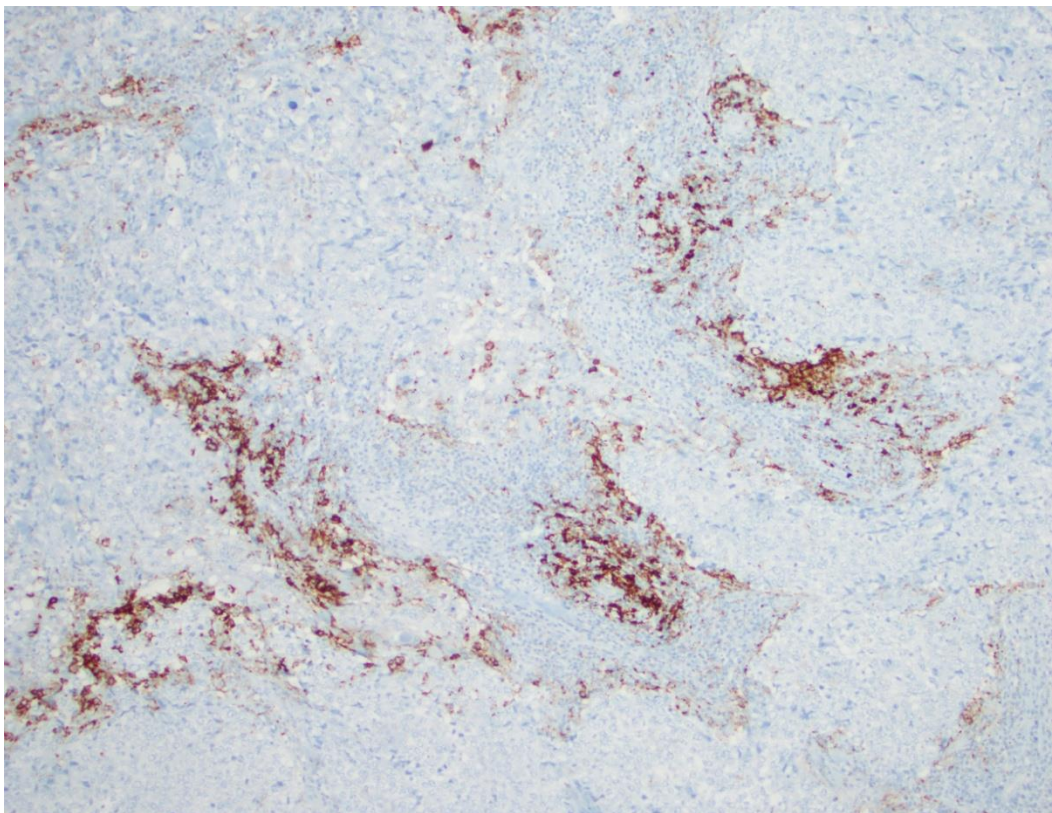
**Foto 16.** Detalle de la tinción de PD-L1 de células dendríticas en el área paracortical (20x).



**Foto 17.** Tinción de PD-L1 en los macrófagos de los senos medulares del ganglio linfático (10x).

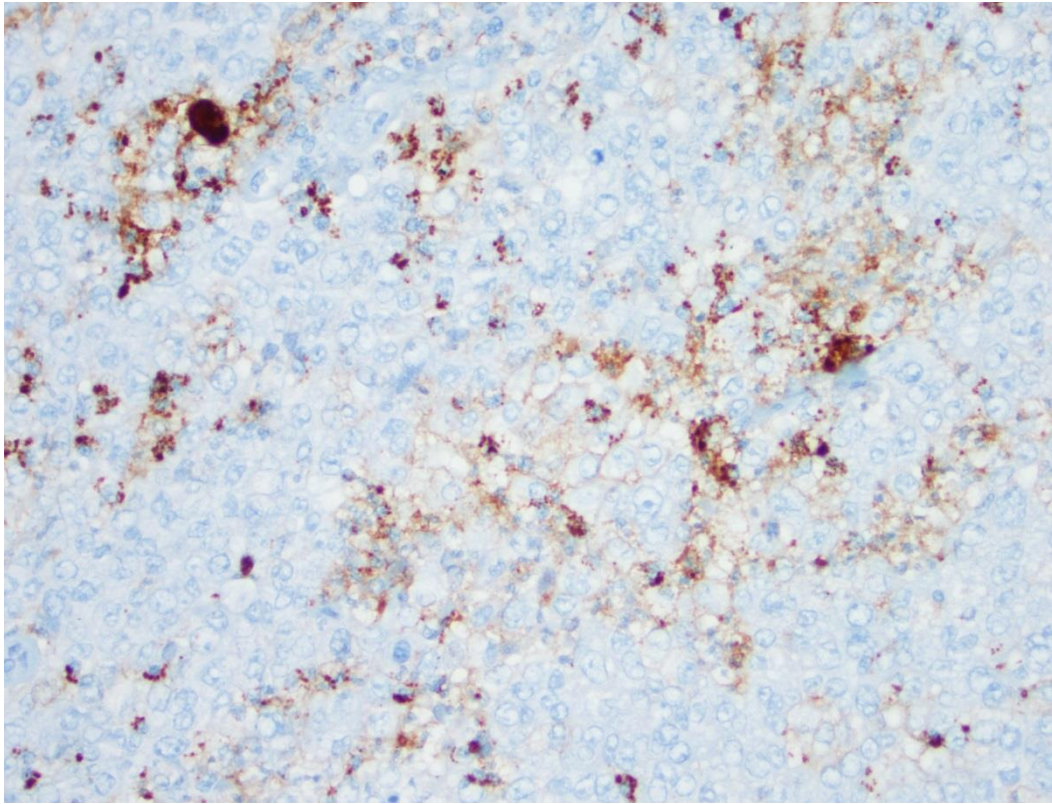


**Foto 18.** Tinción de PD-L1 en las células tumorales (20x).

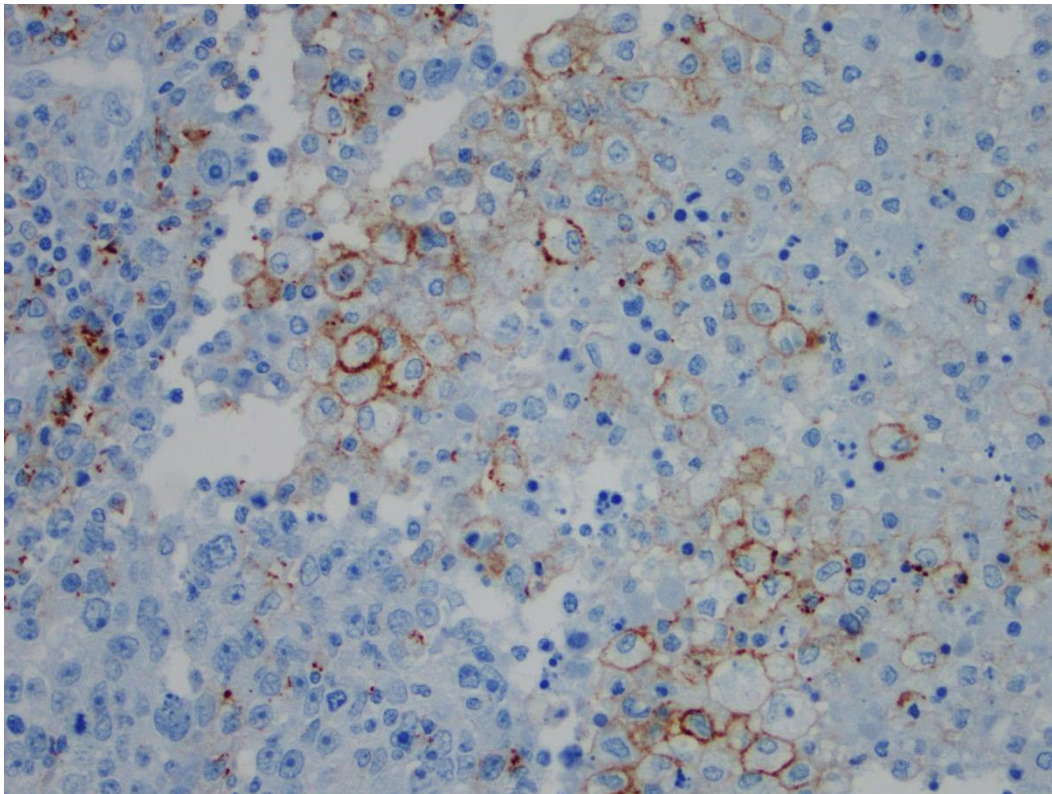


**Foto 19.** Tinción de PD-L1 en las TILs, especialmente las estromales adyacentes al tumor (10x).  
TILs: del inglés *Tumor Infiltrating Lymphocytes*.

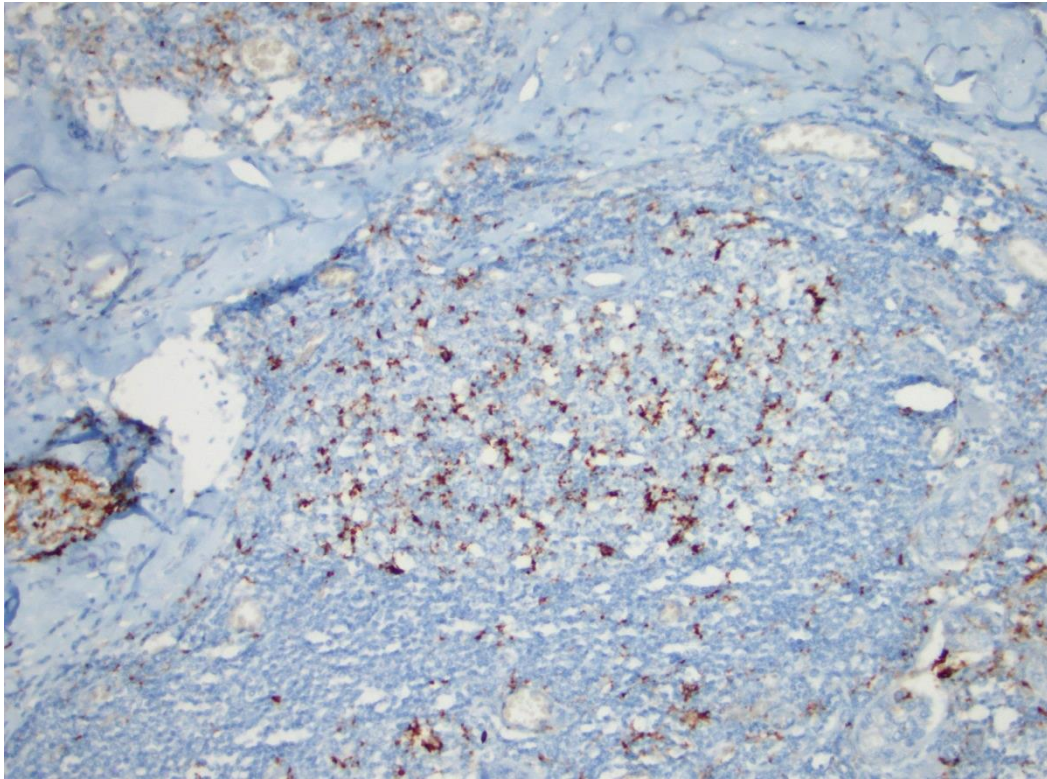




**Foto 20.** Tinción de PD-L1 en el tumor (tinción de membrana) y en los TILs intratumorales (tinción puntiforme) (40x). TILs: del inglés *Tumor Infiltrating Lymphocytes*.



**Foto 21.** Tinción de PD-L1 en macrófagos (40x). Se distinguen de las células tumorales al no formar estructuras tan compactas como un nido (izquierda abajo), y su citoplasma tiene un color distinto.



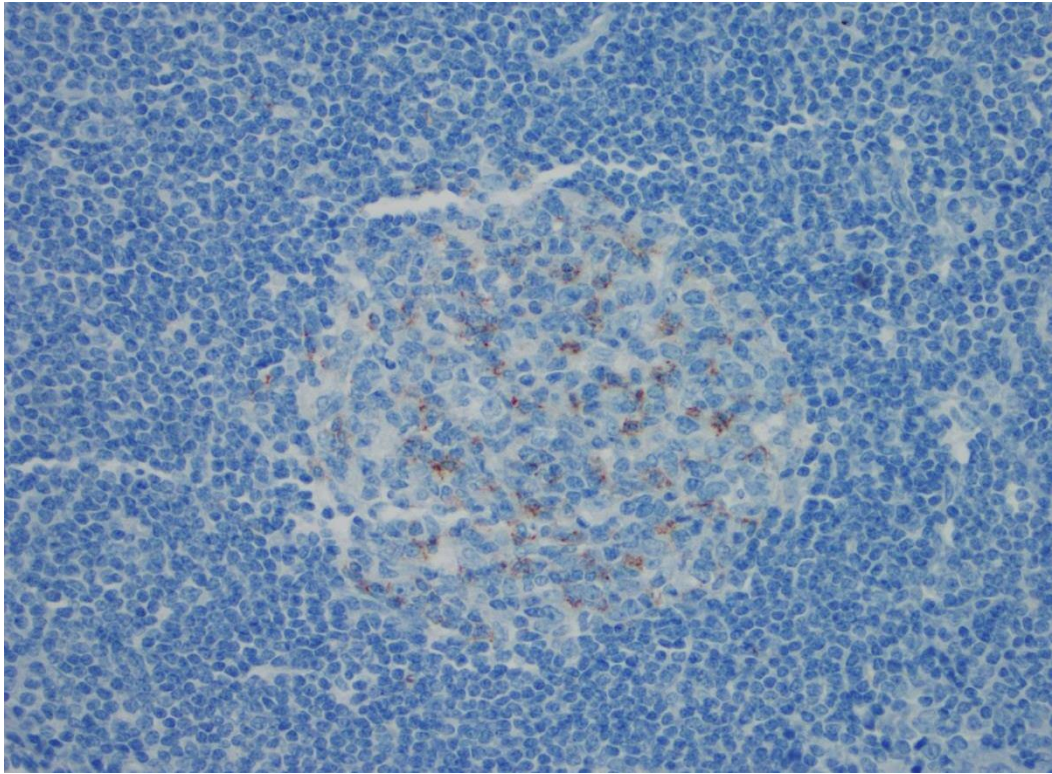
**Foto 22.** Tinción de PD-L1 en un TLS (20x)  
TLS: del inglés *Tertiary Lymphoid Structure*

#### 12.1.4. Tinción de PD-L2

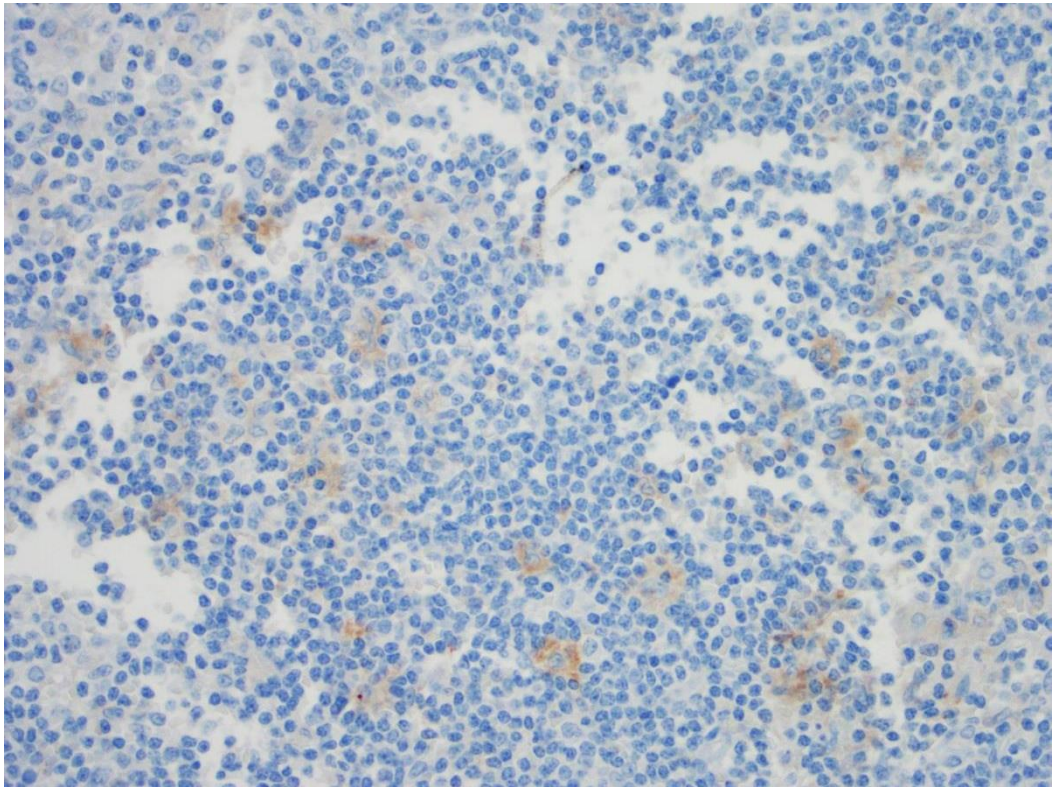
El anticuerpo PD-L2 usado en el proyecto tiene una tinción muy débil en general, excepto cuando tiñe los macrófagos, que suelen tener una tinción citoplasmática más intensa.

En el ganglio, hay tinción en varias zonas: tinción puntiforme posiblemente de los linfocitos B en los centros germinales (Foto 23), tinción difusa probablemente en las células dendríticas del área paracortical (Foto 24), y tinción citoplasmática de los macrófagos de los senos medulares (Foto 25) de ambos grupos. Se valora por separado los CG del resto del ganglio al ser ambas tinciones (difusa y de membrana) en células que son presentadoras de antígenos y que por tanto tienen una función muy similar.

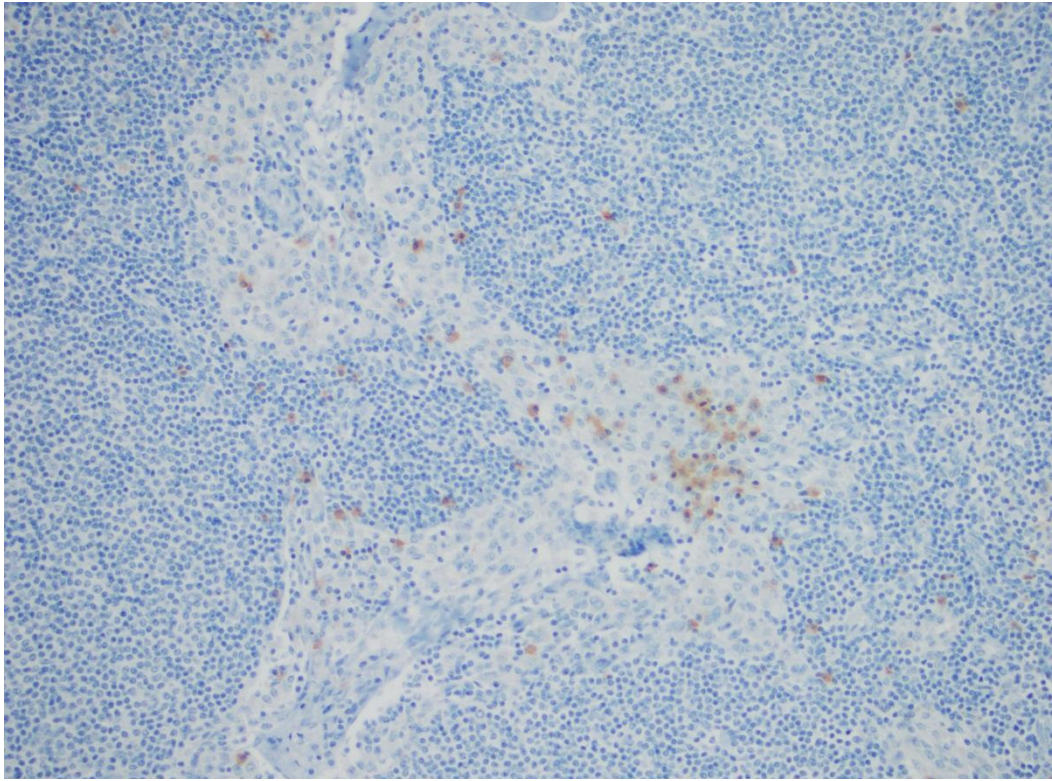
En el tumor, la tinción es prácticamente nula en las células tumorales, aunque se han observado algunas muestras de TILs+ que sí que presentaban tinción (Foto 26). Sí que hay tinción en los TLS (Foto 27), y en los linfocitos y macrófagos de las pacientes TILs+ (Foto 28). Por tanto, no se hace ninguna comparación entre los dos grupos de pacientes.



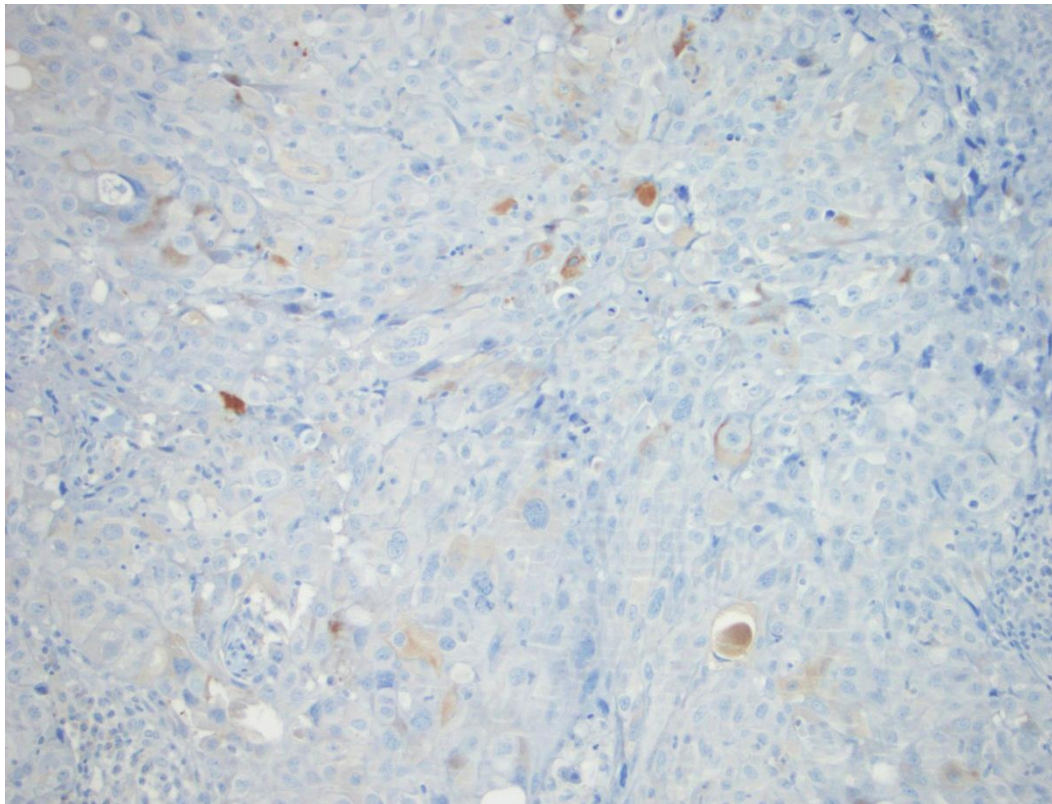
**Foto 23.** Tinción de PD-L2 en un centro germinal (40x).



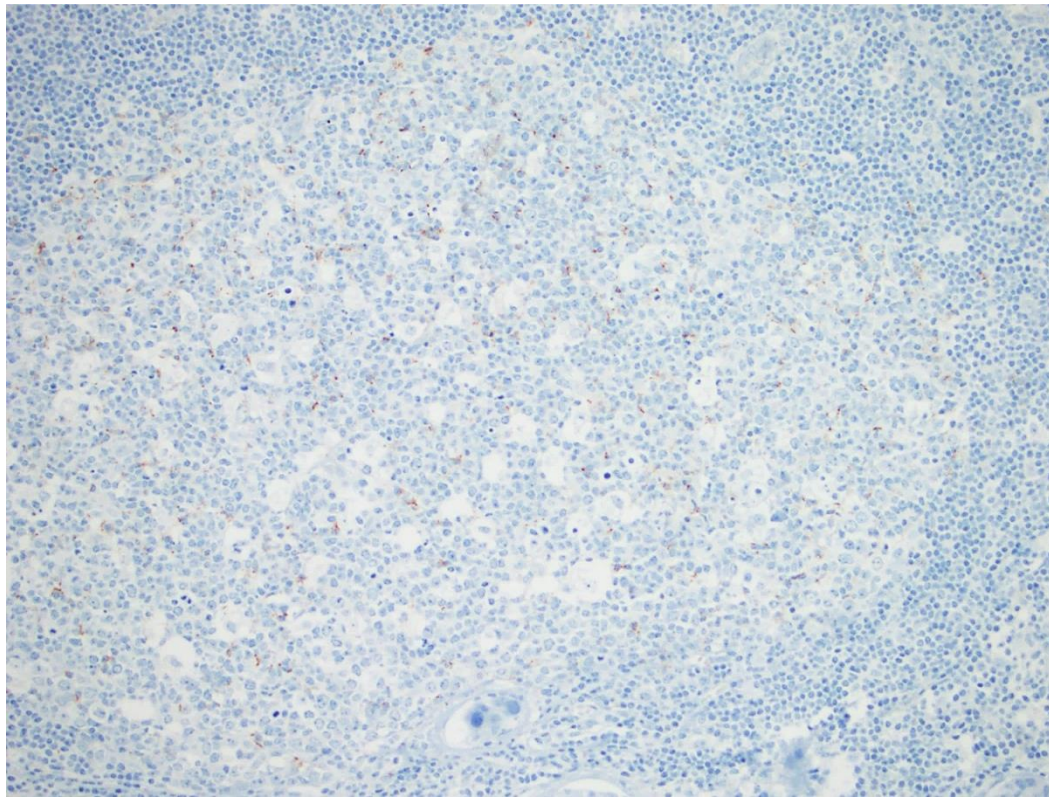
**Foto 24.** Tinción de PD-L2 en la zona paracortical, posiblemente en las células dendríticas (40x).



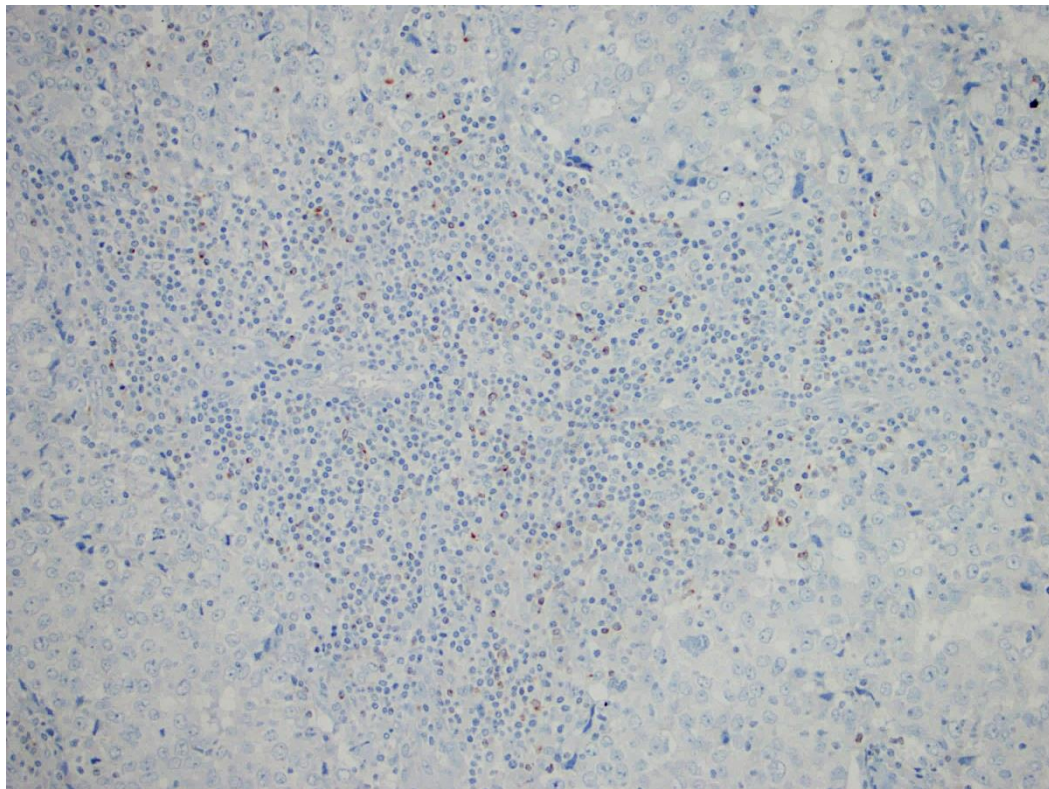
**Foto 25.** Tinción de PD-L2 en los macrófagos de los senos medulares y médula (20x).



**Foto 26.** Tinción de PD-L2 en células tumorales de una paciente TILs+ (20x).  
TILs: del inglés *Tumor Infiltrating Lymphocytes*.



**Foto 27.** Tinción de PD-L2 en un TLS (20x).  
TLS: del inglés *Tertiary Lymphoid Structures*



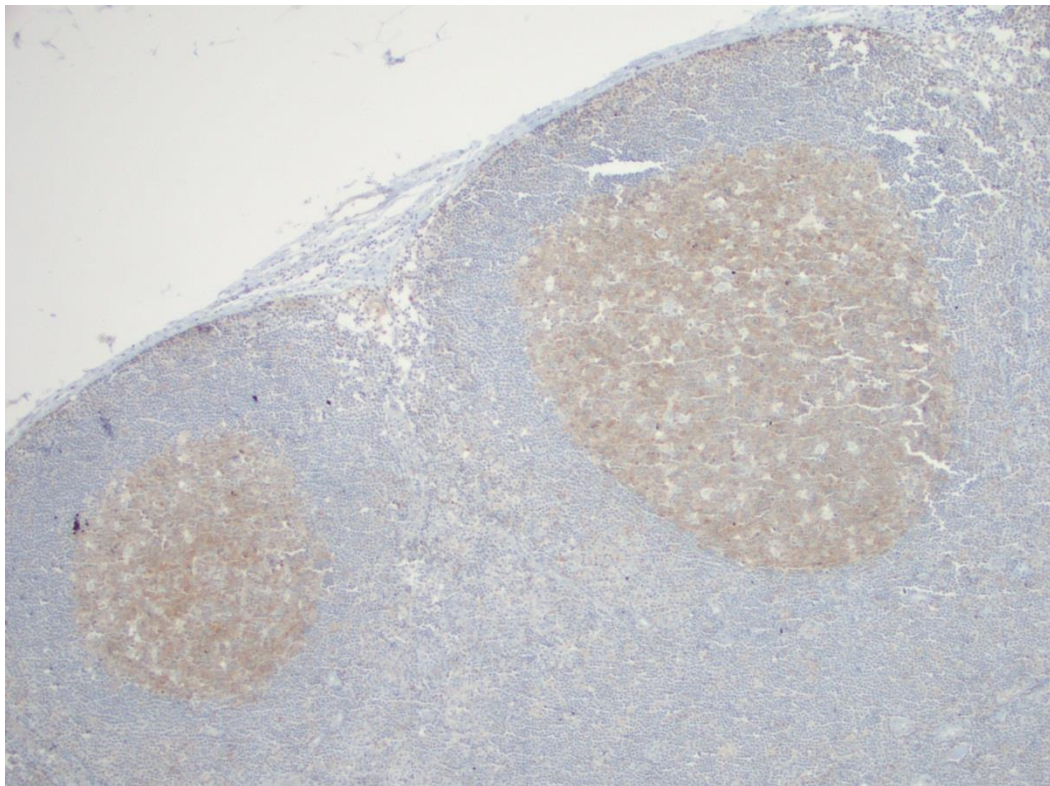
**Foto 28.** Tinción de PD-L2 en las TILs estromales (20x).  
TILs: del inglés *Tumor Infiltrating Lymphocytes*.

### 12.1.5. Tinción de OX-40

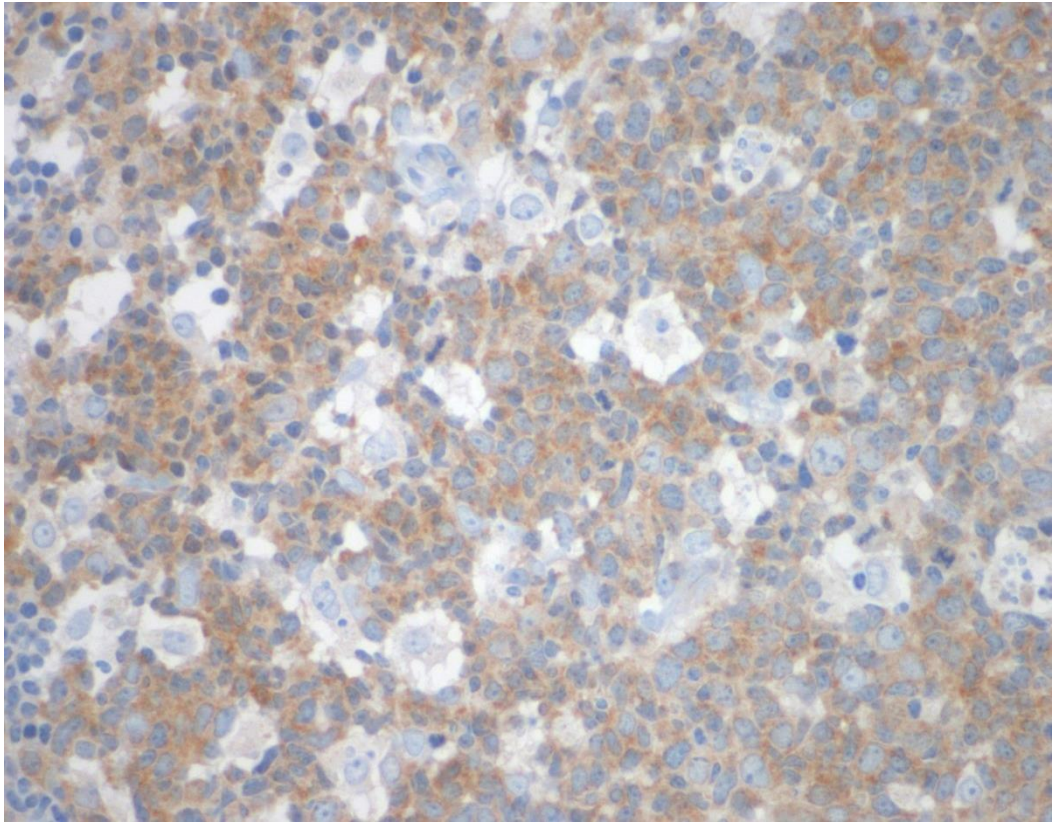
En el ganglio, tiñe varias células en diferentes zonas: todo el CG excepto los macrófagos (Foto 29, Foto 30); los folículos primarios y secundarios (Foto 31); las células dendríticas y los linfocitos T (posiblemente, ya que la tinción es muy extensa) del área paracortical (Foto 32); y los macrófagos de los senos medulares (tinción citoplasmática) y los linfocitos de la médula (Foto 33). En varios ganglios la tinción es muy intensa en prácticamente todas las zonas (Foto 34). Debido a esto, y que en algunos casos es muy difícil distinguir las diferentes zonas, solo se valora solo por separado los centros germinales del resto del ganglio.

En el tumor primario, el OX-40 tiñe los nidos tumorales (Foto 35, tinción de membrana; y Foto 36, tinción citoplasmática) y los linfocitos (Foto 37), por lo que se valora por separado para comparar la tinción solo en las células tumorales entre los dos grupos. También tiñe prácticamente todo el TLS excepto los macrófagos (Foto 38), como ocurre en los centros germinales. Se vieron también muestras de pacientes TILs+ donde la tinción de OX-40 estaba predominantemente en las TILs adyacentes al tumor, que podrían ser linfocitos T reguladores (Foto 39 y Foto 40).

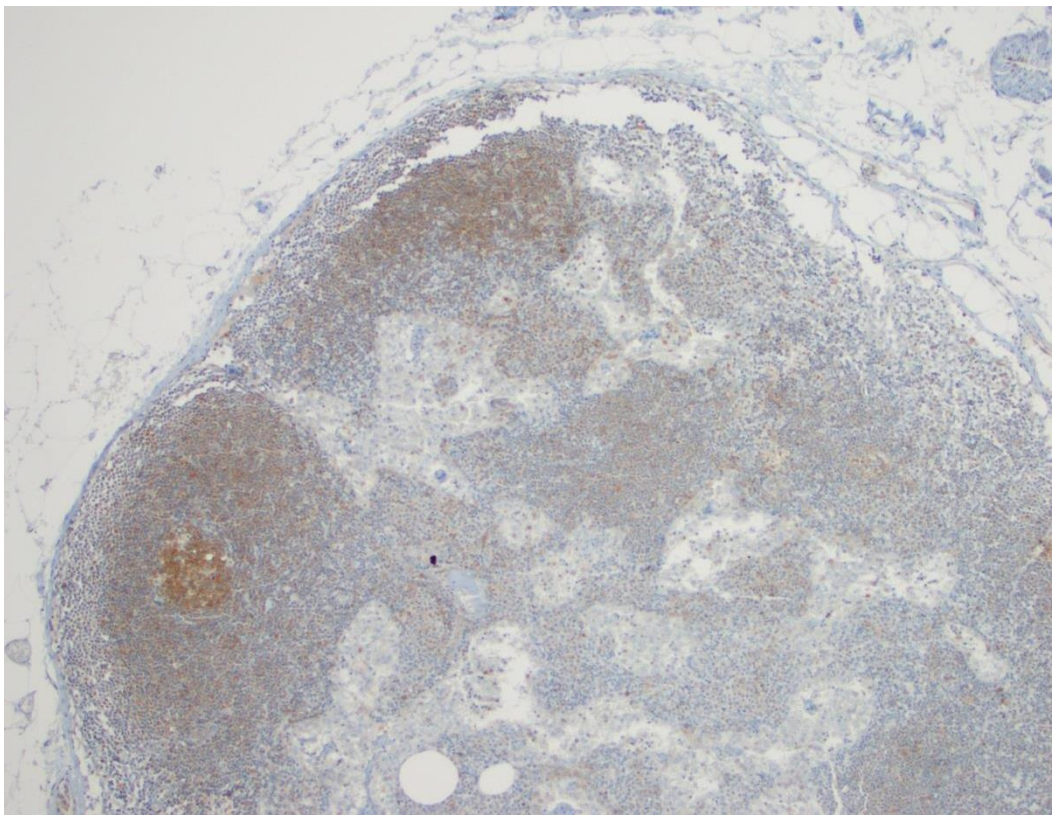
De todos los marcadores, es el que tiñe con más intensidad todas las estructuras evaluadas.



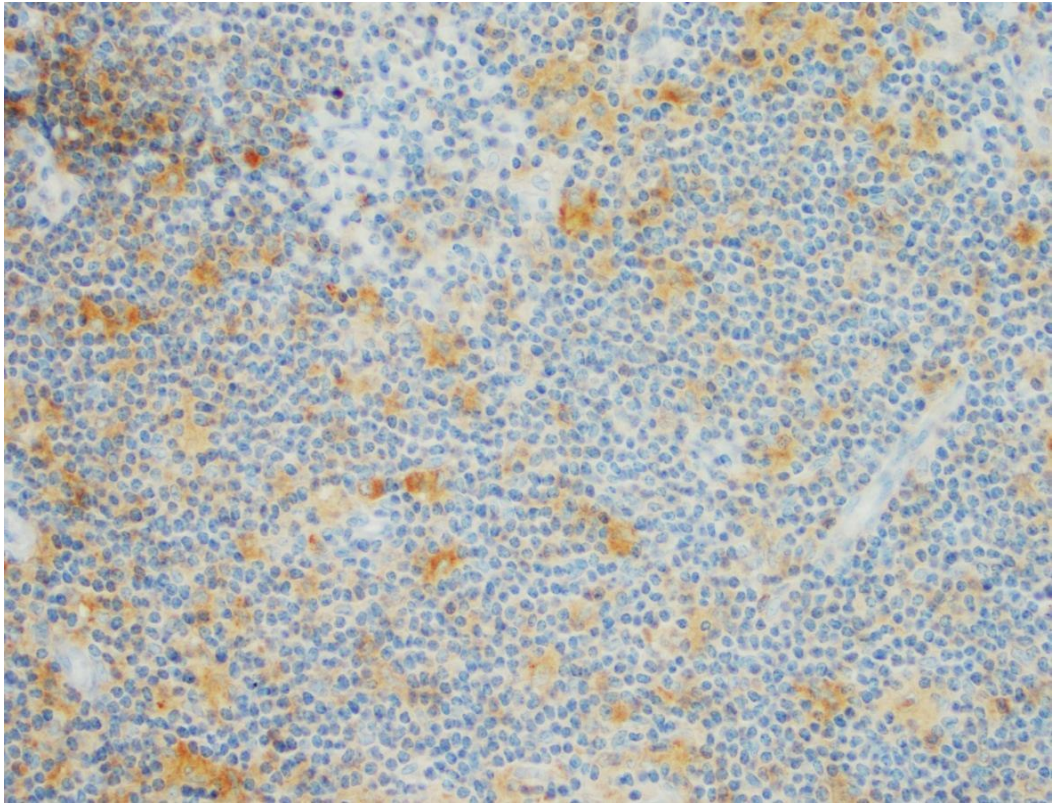
**Foto 29.** Tinción de OX-40 del centro germinal y borde capsular (10x).



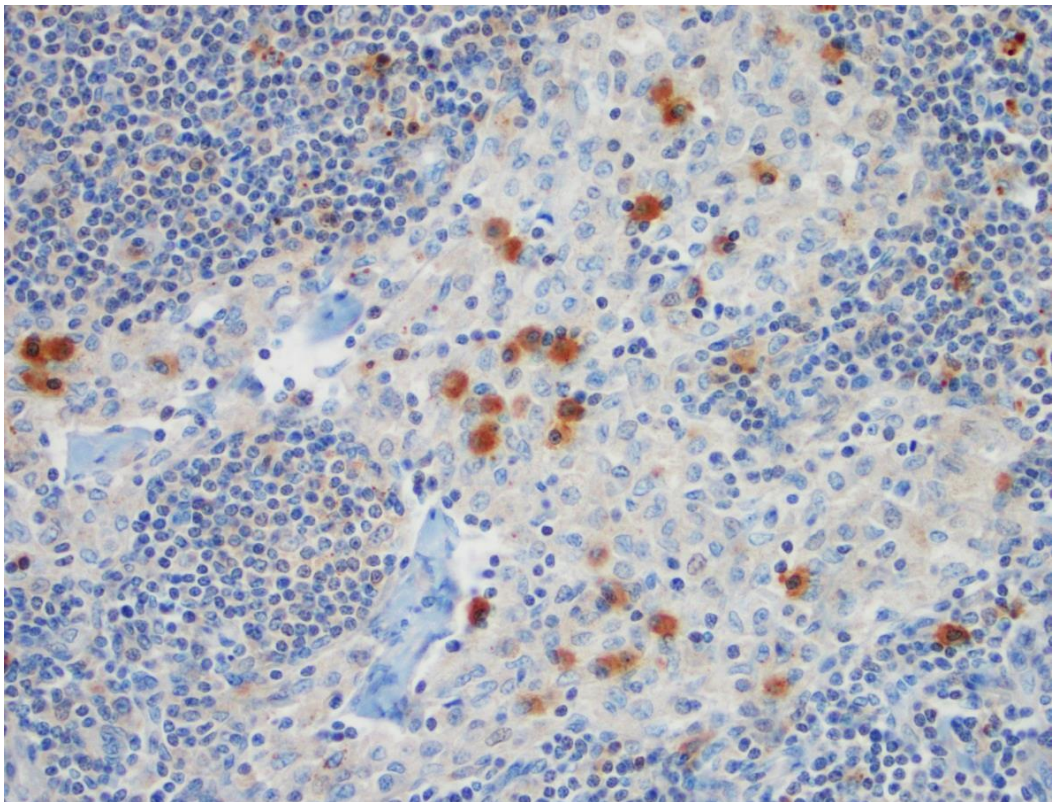
**Foto 30.** Detalle del centro germinal, donde se aprecia que el OX-40 no tiñe los macrófagos (60x).



**Foto 31.** Tinción de OX-40 de un folículo primario (centro arriba) y un folículo secundario con centro germinal (izquierda abajo) (10x).



**Foto 32.** Tinción de OX-40 difusa de células dendríticas y linfocitos de la zona paracortical (40x).

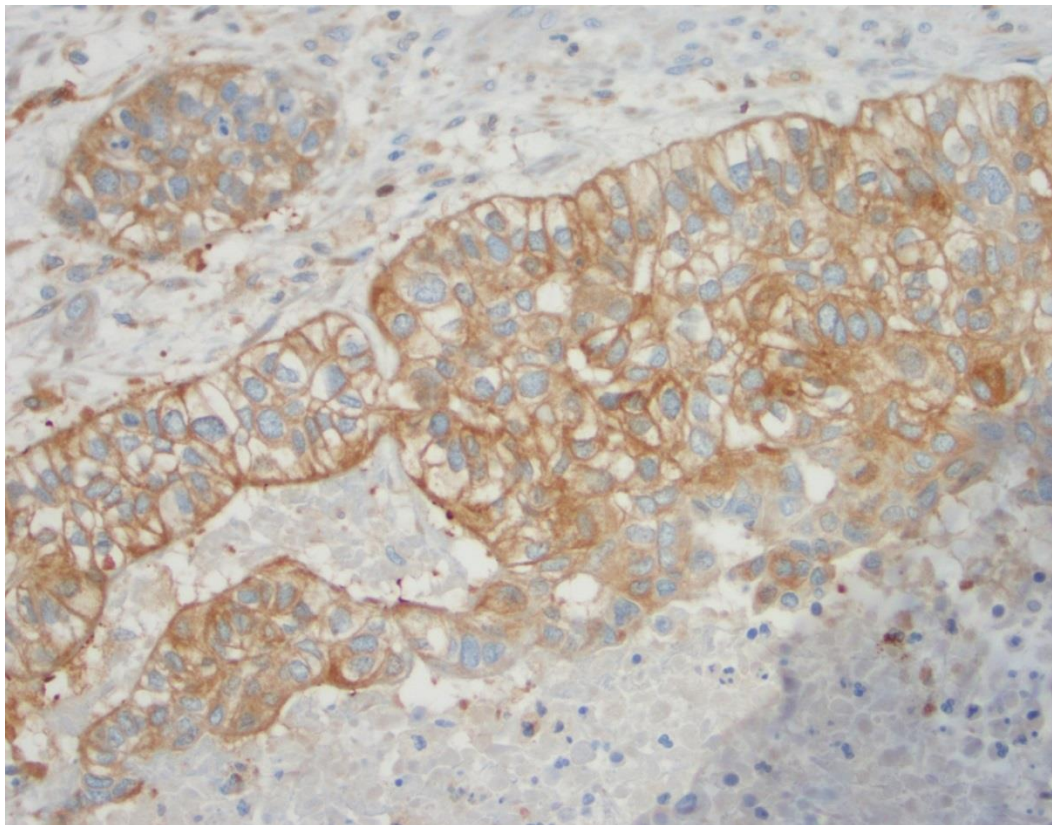


**Foto 33.** Tinción de OX-40 citoplasmática intensa de macrófagos y linfocitos en senos medulares y linfocitos de la médula (40x)

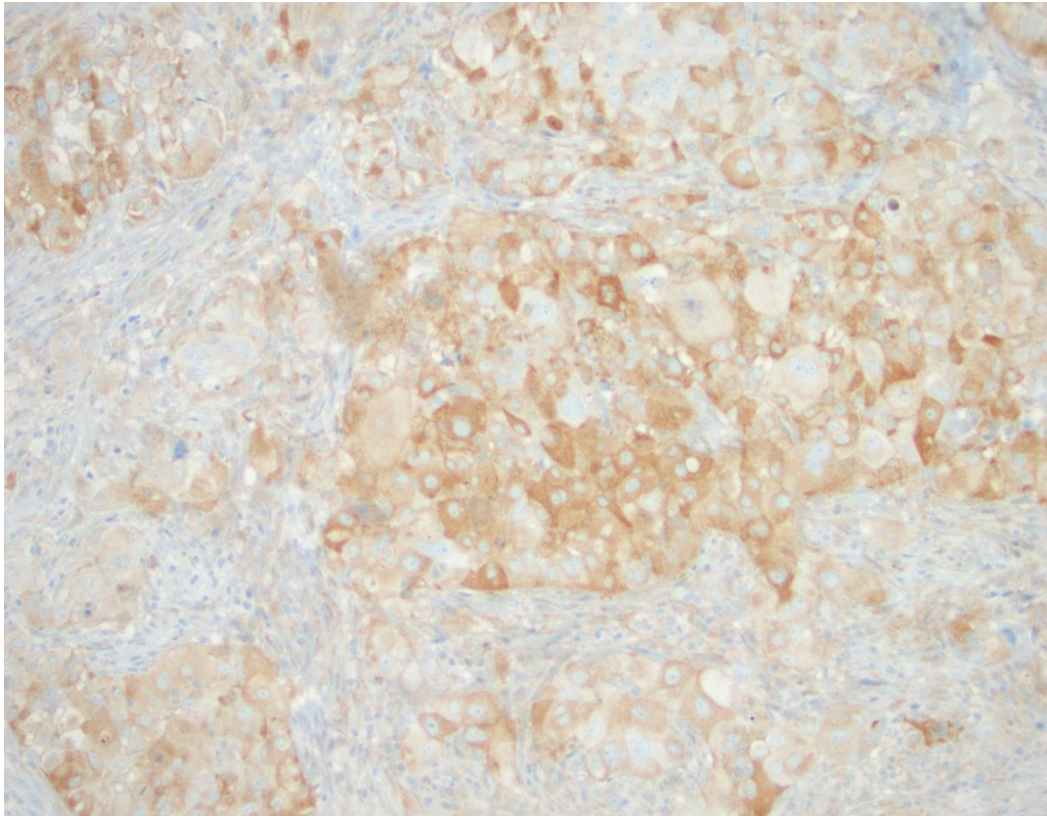




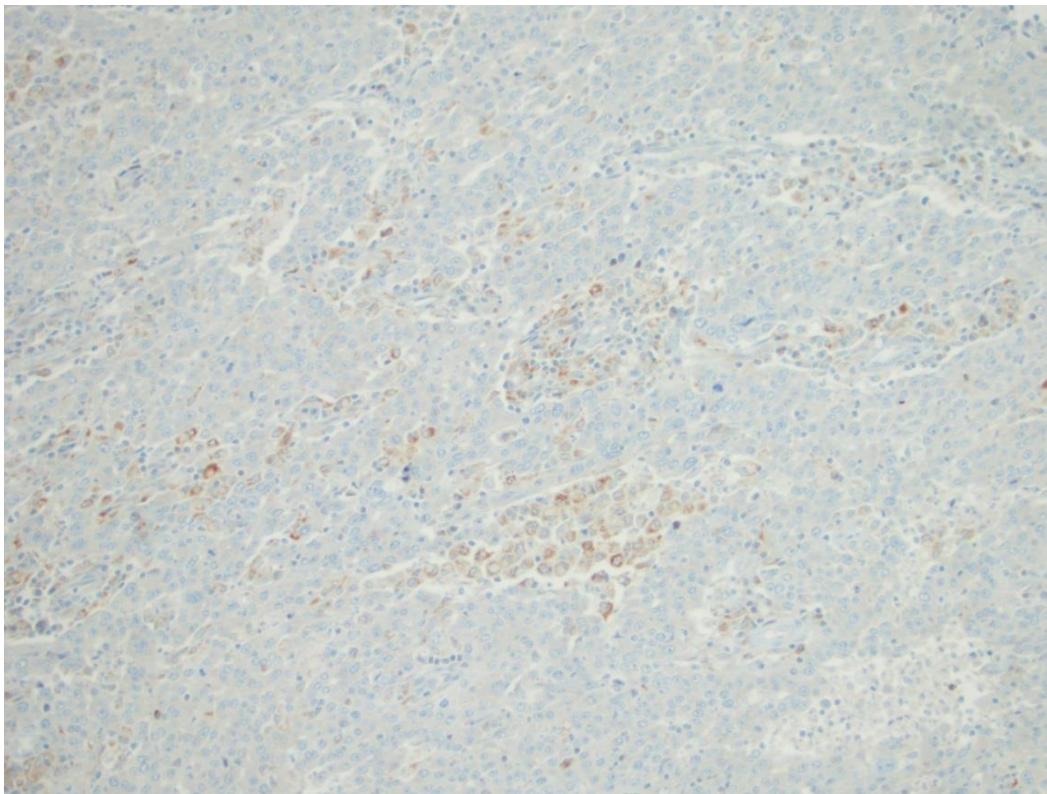
**Foto 34.** Tinción de OX-40 intensa en todo el ganglio de una paciente TILs- (4x).  
TILs: del inglés *Tumor Infiltrating Lymphocytes*



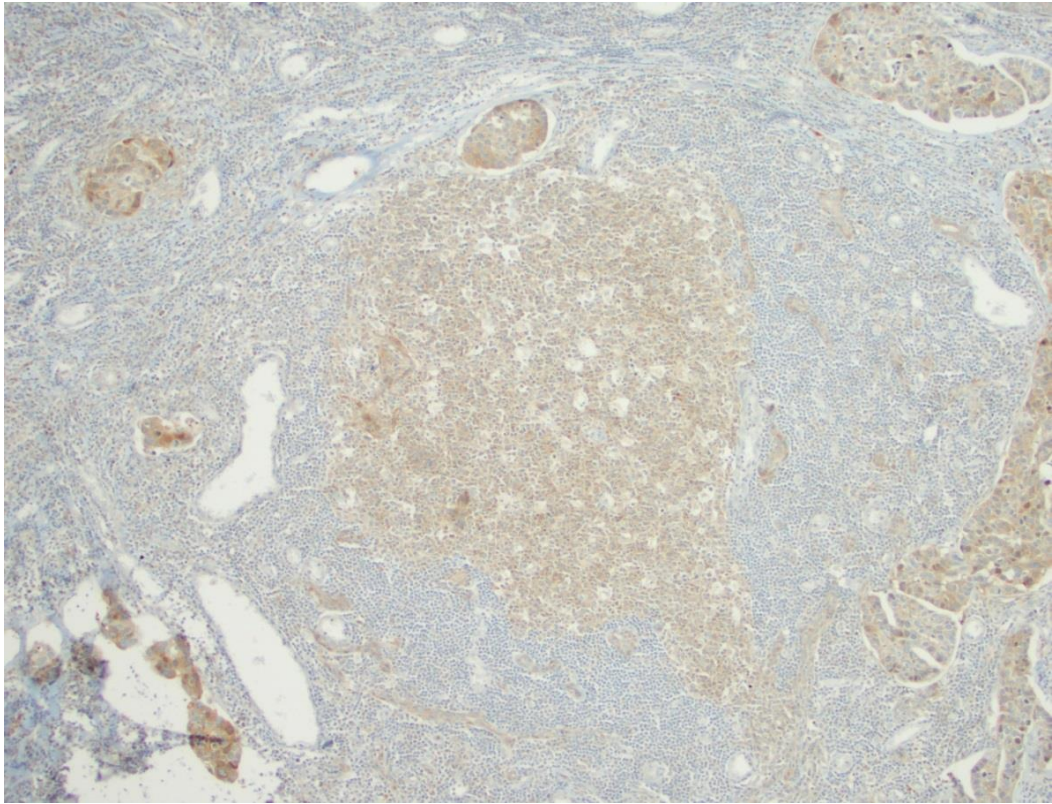
**Foto 35.** Tinción de OX-40 de membrana en las células tumorales (40x).



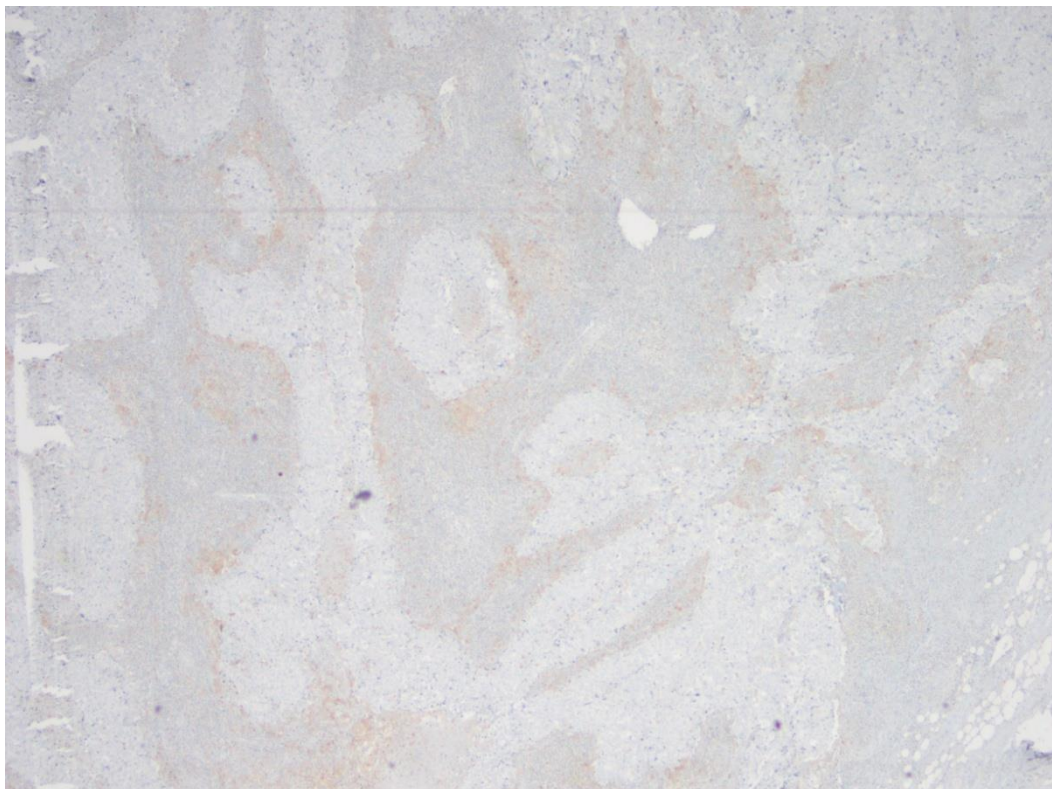
**Foto 36.** Tinción de OX-40 citoplasmática en células tumorales (20x).



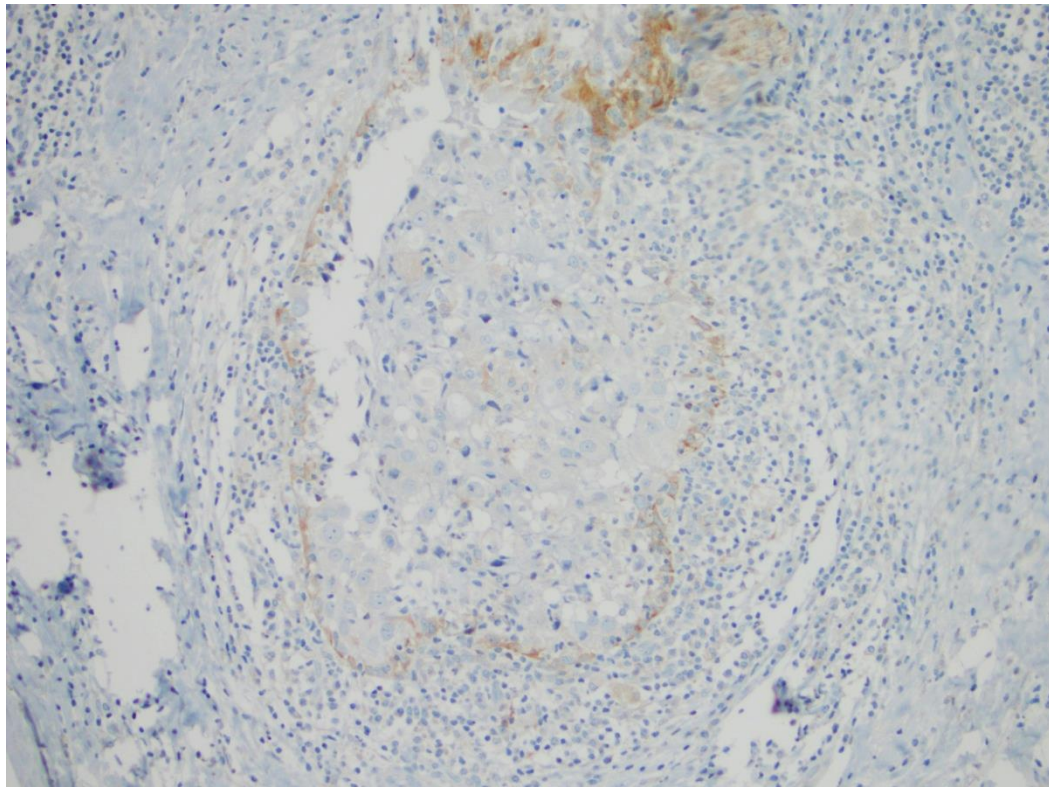
**Foto 37.** Tinción de OX-40 en TILs estromales y prácticamente nulo en las células tumorales (20x).  
TILs: del inglés *Tumor Infiltrating Lymphocytes*



**Foto 38.** Tinción de OX-40 de una estructura linfática terciaria dentro del área tumoral (10x).



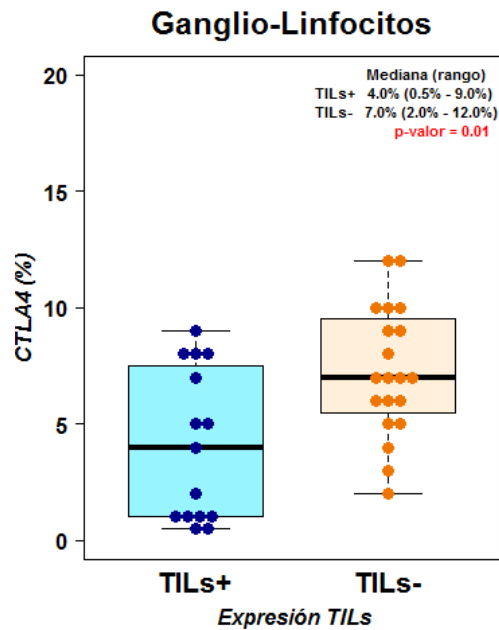
**Foto 39.** Tinción de OX-40 en las TILs adyacentes al tumor (podrían ser T reguladoras) (4x).  
TILs: del inglés *Tumor Infiltrating Lymphocytes*



**Foto 40.** Detalle tinción de OX-40 en las TILs del borde de un nido tumoral (20x).  
TILs: del inglés *Tumor Infiltrating Lymphocytes*

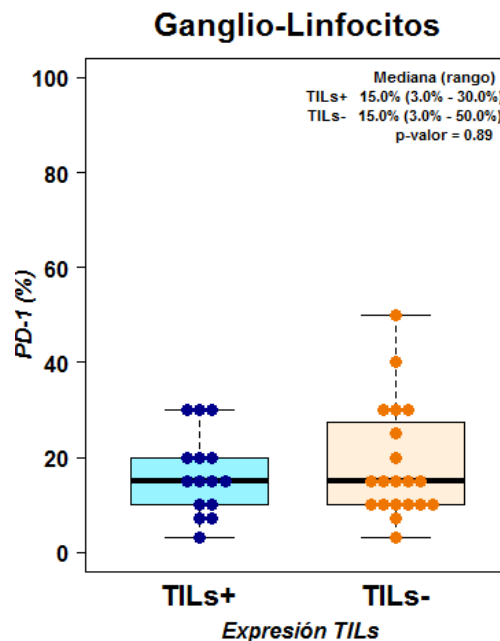
### 12.1. Comparación de la tinción de los biomarcadores en los ganglios linfáticos entre las pacientes con niveles altos y bajos de *Tumor Infiltrating Lymphocytes*

CTLA-4: Se observa más expresión del CTLA-4 en los linfocitos de los ganglios de pacientes TILs- que en las TILs+ (mediana 7% vs. 4%), siendo estadísticamente significativa ( $p = 0.01$ ) (Figura 28). El rango de tinción de las pacientes TILs- es [2.0% - 12%] y el de las pacientes TILs+ [0.5% - 9%]. Este resultado se obtuvo valorando la tinción de los linfocitos (tinción de membrana y tamaño más pequeño) sin tener en cuenta la tinción en los macrófagos (tinción citoplasmática y célula más grande). No se valoró la tinción de los macrófagos entre las pacientes ya que no era necesario para testar la hipótesis principal.



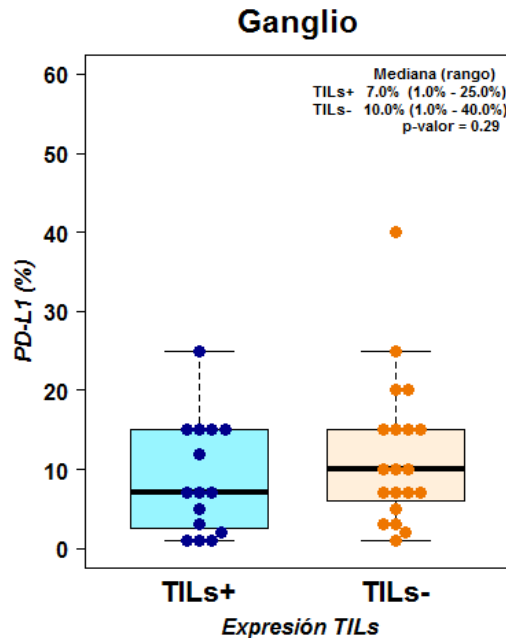
**Figura 28.** *Box-plot* o diagrama de caja para expresar la diferencia de expresión de CTLA-4 en los linfocitos del ganglio entre las pacientes con alta expresión de TILs (TILs+) y baja expresión (TILs-). TILs: del inglés *Tumor Infiltrating Lymphocytes*.

PD-1: La tinción de PD-1 en los linfocitos de los ganglios las pacientes TILs- tiende a ser más alta (rango [3% - 50%] vs. [3% - 30%]), pero la mediana es 15% para ambas, no siendo estadísticamente significativo ( $p = 0.89$ ) (Figura 29). Esta valoración corresponde solo a la tinción de linfocitos porque el anticuerpo solo teñía este tipo de célula.



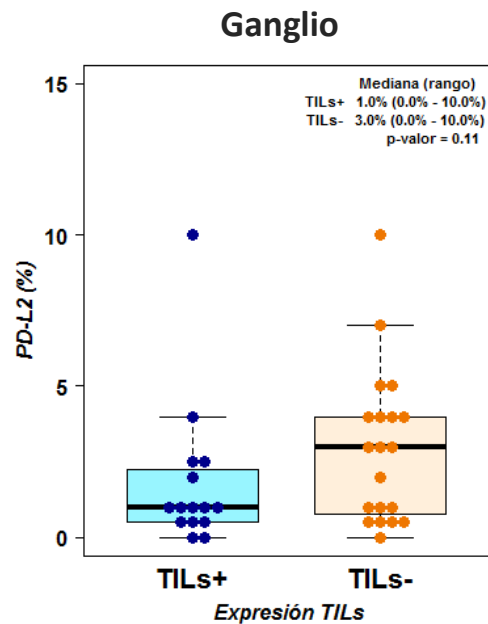
**Figura 29.** *Box-plot* o diagrama de caja para expresar la diferencia de expresión de PD-1 en todo de los linfocitos del ganglio entre las pacientes con alta expresión de TILs (TILs+) y baja expresión (TILs-). TILs: del inglés *Tumor Infiltrating Lymphocytes*.

**PD-L1:** Hay mayor tinción de PD-L1 en los ganglios de las pacientes TILs- (mediana 10% vs. 7%), pero no es estadísticamente significativa ( $p = 0.29$ ) (Figura 30). El rango de tinciones de las pacientes TILs- era [1% - 40%] y el de las TILs+ [1% - 25%]. Esta valoración refleja la tinción de varios tipos de células (especialmente células presentadoras de antígenos) ante la imposibilidad de valorar las diferentes zonas por separado.



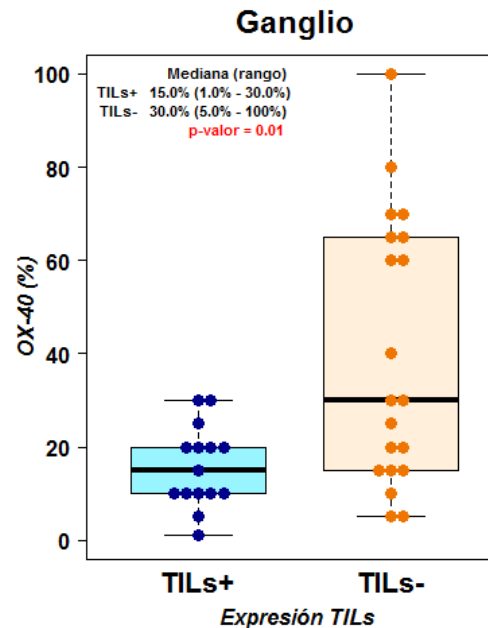
**Figura 30.** *Box-plot* o diagrama de caja para expresar la diferencia de expresión de PD-L1 en el ganglio linfático entre las pacientes con alta expresión de TILs (TILs+) y baja expresión (TILs-). TILs: del inglés *Tumor Infiltrating Lymphocytes*.

**PD-L2:** Hay una tendencia estadística hacia una mayor tinción de PD-L2 en los ganglios de pacientes con TILs- que en las de TILs+ (mediana 3.0% vs. 1.0%) ( $p = 0.11$ ); ambas tinciones de las pacientes tienen el mismo rango y es [0% - 10%] (Figura 31). Esta valoración refleja la tinción de varios tipos de células ante la imposibilidad de valorar las diferentes zonas por separado. Por las anotaciones durante las valoraciones se observa que la tinción más alta en las pacientes TILs- es debido sobre todo a que hay más pacientes que tienen tinción difusa extensa que lo más probable es que sea en la zona paracortical donde las células dendríticas generan muchas interdigitaciones para hacer la presentación de antígenos a los linfocitos T.



**Figura 31.** *Box-plot* o diagrama de caja para expresar la diferencia de expresión de PD-L2 en el ganglio linfático entre las pacientes con alta expresión de TILs (TILs+) y baja expresión (TILs-). TILs: del inglés *Tumor Infiltrating Lymphocytes*.

OX-40: se observa más expresión de OX-40 en las pacientes TILs- (mediana 30% vs. 15%) y más variabilidad en el ganglio de las pacientes TILs- (rango [5%-100%] vs. [1%-30%]), siendo estadísticamente significativo ( $p = 0.01$ ) (Figura 32). Esta valoración refleja la tinción de varios tipos de células ante la imposibilidad de valorar las diferentes zonas por separado.

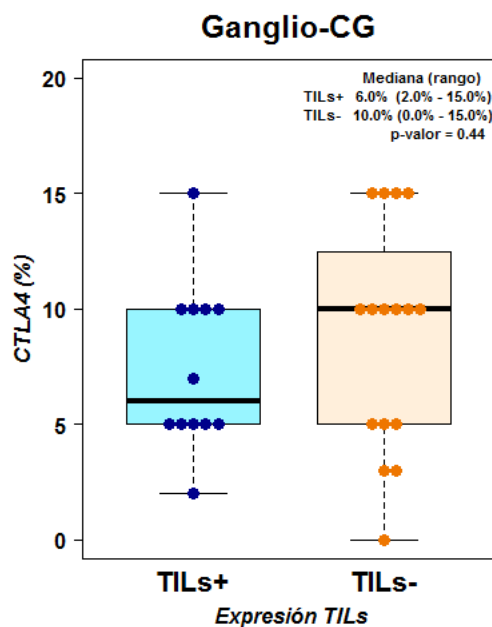


**Figura 32.** *Box-plot* o diagrama de caja para expresar la diferencia de expresión de OX-40 en el ganglio linfático entre las pacientes con alta expresión de TILs (TILs+) y baja expresión (TILs-). TILs: del inglés *Tumor Infiltrating Lymphocytes*.

## 12.2. Comparación de la tinción de los biomarcadores en los centros germinales entre las pacientes con niveles altos y bajos de *Tumor Infiltrating Lymphocytes*

En aquellos ganglios que presentaban varios CG, se hizo una media de la tinción de todos. Los que no tenían CG no se incluyeron en la comparación, para distinguir aquellos CG que estaban presentes pero que no tenían tinción (valorado 0%).

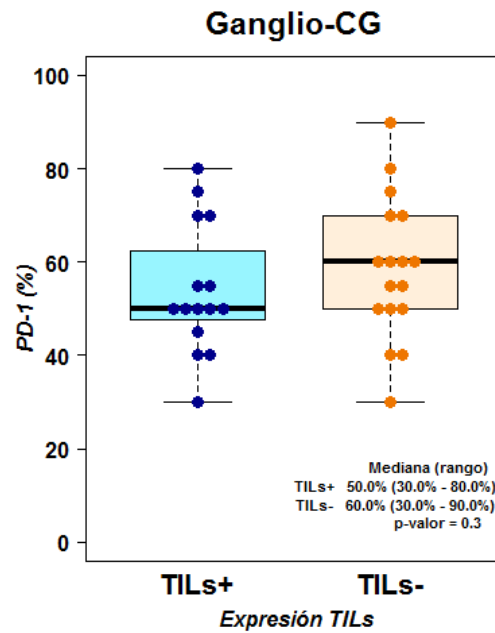
**CTLA-4:** hay mayor tinción de CTLA-4 en los centros germinales de las pacientes TILs- (mediana 10% vs. 6%), siguiendo la misma tendencia que en los linfocitos del ganglio, pero no es estadísticamente significativa ( $p = 0.44$ ) (Figura 33). El rango de tinciones es bastante parecido entre ambos grupos de pacientes ([0% - 15%] en TILs- y [2% - 15%] en TILs+).



**Figura 33.** *Box-plot* o diagrama de caja para expresar la diferencia de expresión de CTLA-4 en el centro germinal (CG) entre las pacientes con alta expresión de TILs (TILs+) y baja expresión (TILs-). TILs: del inglés *Tumor Infiltrating Lymphocytes*.

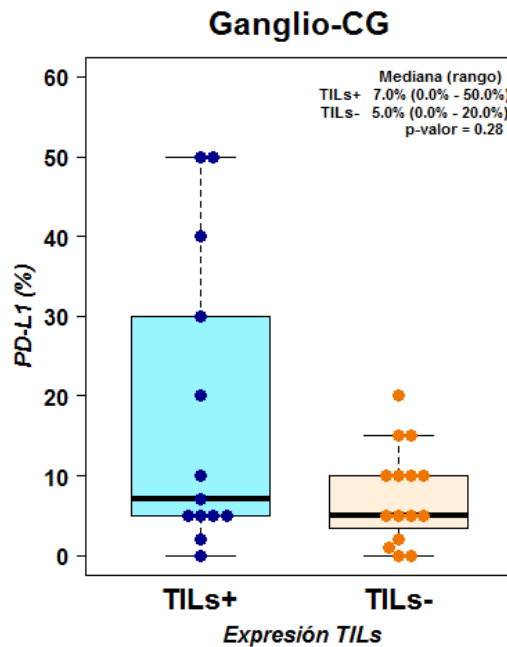
**PD-1:** En los CG, la tinción de PD-1 es numéricamente más alta en las pacientes TILs- (60% vs. 50%), pero no llega a ser estadísticamente significativa ( $p = 0.3$ ) (Figura 34). El rango de tinciones es bastante parecido entre los dos grupos de pacientes ([30% - 90%] en TILs- y [30% - 80%] en TILs+).





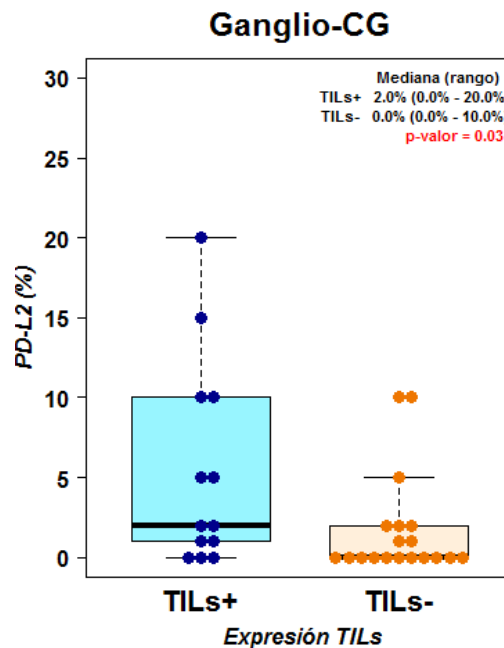
**Figura 34.** *Box-plot* o diagrama de caja para expresar la diferencia de expresión de PD-1 en el centro germinal (CG) entre las pacientes con alta expresión de TILs (TILs+) y baja expresión (TILs-). TILs: del inglés *Tumor Infiltrating Lymphocytes*.

PD-L1: En los CG la tinción de PD-L1 se invierte en comparación con el resto del ganglio, habiendo numéricamente menos en las pacientes TILs- que las TILs+ (5% vs. 7%) y menor variabilidad (rango [0% - 20%] vs. [0% - 50%]), pero no es estadísticamente significativa ( $p = 0.28$ ) (Figura 35).



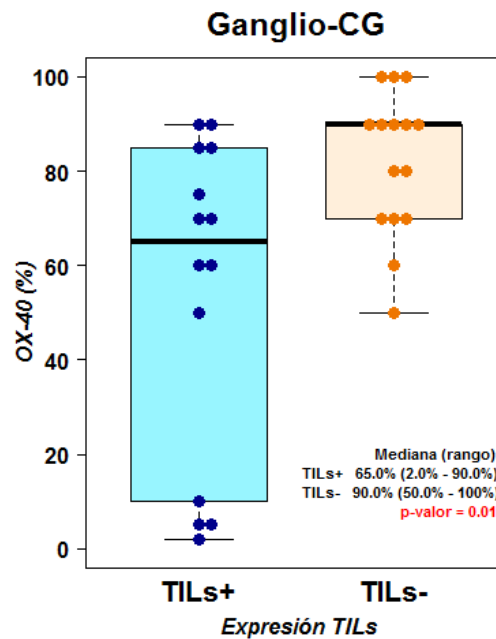
**Figura 35.** *Box-plot* o diagrama de caja para expresar la diferencia de expresión de PD-L1 en el centro germinal (CG) entre las pacientes con alta expresión de TILs (TILs+) y baja expresión (TILs-). TILs: del inglés *Tumor Infiltrating Lymphocytes*.

**PD-L2:** En los CG la tinción de PD-L2 se invierte en comparación con el resto del ganglio, al igual que ocurre con el PD-L1, habiendo menos tinción en las pacientes TILs- que en las TILs+ (mediana 0% vs. 2%). En este caso sí que es estadísticamente significativa ( $p = 0.03$ ) (Figura 36). El rango es de [0% - 20%] en las pacientes TILs+ y [0% - 10%] en las pacientes TILs-.



**Figura 36.** *Box-plot* o diagrama de caja para expresar la diferencia de expresión de PD-L2 en el centro germinal (CG) entre las pacientes con alta expresión de TILs (TILs+) y baja expresión (TILs-). TILs: del inglés *Tumor Infiltrating Lymphocytes*.

**OX-40:** Cuando se compara la expresión de OX-40 en los CG, es mayor en las pacientes TILs- (mediana 90% vs. 65%), al igual que ocurre en el ganglio linfático, y es estadísticamente significativa ( $p = 0.01$ ). Sin embargo, se observa más variabilidad en las pacientes TILs+ (rango [50% - 100%] vs. [2% - 90%]) (Figura 37), al contrario que ocurre en el resto del ganglio. De hecho había varias pacientes, la mayoría TILs+, que tenían mucha tinción en el CG y poca en resto del folículo (ver Foto 29), mientras que otras, en especial las TILs-, tenían mucha tinción en ambas zonas (ver Foto 31).



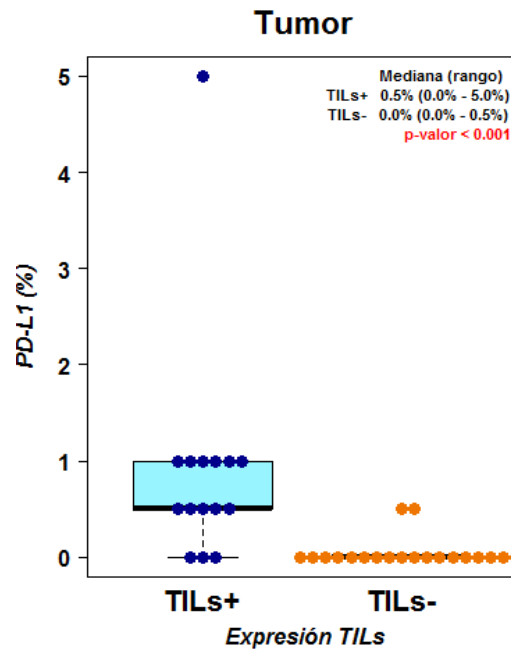
**Figura 37.** *Box-plot* o diagrama de caja para expresar la diferencia de expresión de OX-40 en el centro germinal (CG) entre las pacientes con alta expresión de TILs (TILs+) y baja expresión (TILs-). TILs: del inglés *Tumor Infiltrating Lymphocytes*.

### 12.3. Comparación de la tinción de los biomarcadores en el tumor entre las pacientes con niveles altos y bajos de *Tumor Infiltrating Lymphocytes*

Solo se pudo comparar la tinción de PD-L1 y OX-40 en las células tumorales ya que el resto de biomarcadores solo teñían las TILs (CTLA-4, PD-1 y PD-L2) o la tinción en las células tumorales era en muy pocas muestras y poco extensa (PD-L2).

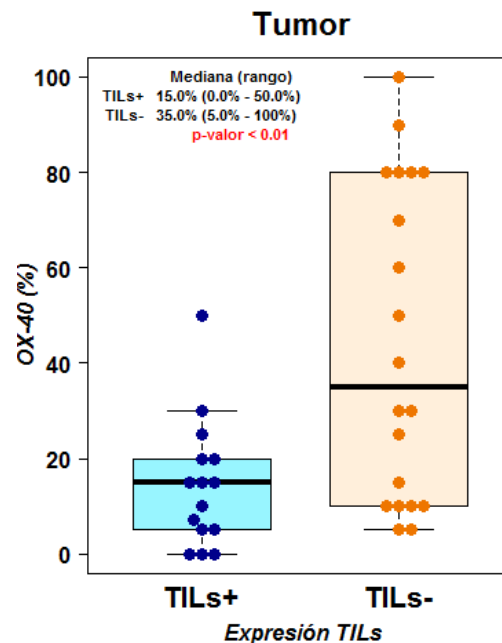
Se valoró los cinco biomarcadores en la infiltración linfocitaria de las pacientes TILs+. La mediana de la tinción fue: 4%, rango [1% - 10%] para CTLA-4; 15%, rango [5% - 25%] para PD-1; 15%, rango [3% - 60%] para PD-L1; 1%, rango [0% - 10%] para PD-L2; 10%, rango [2% - 30%] para OX-40.

PD-L1: Se compara la tinción de las células tumorales entre los dos grupos, donde se observa estadísticamente significativa que las pacientes TILs- apenas tienen tinción en las células tumorales respecto a las pacientes TILs+ ( $p < 0.001$ ) (Figura 38). Las pacientes TILs+ presentan algo más de tinción (mediana 0.5% vs. 0%), habiendo solo una muestra con tinción del 5% y la mayoría del 1%.



**Figura 38.** *Box-plot* o diagrama de caja para expresar la diferencia de expresión de PD-L1 en las células tumorales entre las pacientes con alta expresión de TILs (TILs+) y baja expresión (TILs-). TILs: del inglés *Tumor Infiltrating Lymphocytes*.

OX-40: Se observa más tinción de OX-40 en los nidos tumorales de las pacientes TILs- que las TILs+ (mediana 35% vs. 15%), siendo la diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.01$ ). Las pacientes TILs- presentan mucha más variabilidad (rango [5% - 100%] vs. [0% - 50%]) (Figura 39).



**Figura 39.** *Box-plot* o diagrama de caja para expresar la diferencia de expresión de OX-40 en las células tumorales entre las pacientes con alta expresión de TILs (TILs+) y baja expresión (TILs-). TILs: del inglés *Tumor Infiltrating Lymphocytes*.

#### 12.4. Comparación entre la tinción del PD-L1 en las células tumorales vs. inmunes de las pacientes con niveles altos de *Tumor Infiltrating Lymphocytes*

En las pacientes TILs+, se ha observado que cuando las células tumorales están teñidas, los TILs estromales adyacentes al tumor suelen ser también PD-L1+ (Foto 19). Se siguió la metodología de O. Tawfik *et al.*<sup>87</sup> –donde usaron el mismo clon de PD-L1 que en nuestro proyecto– para hacer las variables dicotómicas. Se tomó entonces como punto de corte 1% en las células tumorales y 10% en el infiltrado linfocitario como definición de PD-L1+, y se hicieron comparaciones. Se observaron que no hay muestras que sean PD-L1+ en el tumor y PD-L1- en las TILs (Tabla 15).

**Tabla 15.** Comparación entre la expresión de PD-L1 de las células tumorales y el infiltrado linfocitario en las 15 pacientes TILs+, siendo estadísticamente significativo ( $p < 0.01$ ).

Expresión de PD-L1 en las células tumorales*	Expresión de PD-L1 en el infiltrado linfocitario <sup>#</sup>		Total
	Negativo	Positivo	
Negativo	5 (33.3%)	2 (13.3%)	7 (36.6%)
Positivo	0 (0.0%)	8 (53.4%)	8 (53.4%)
Total	5 (33.3%)	10 (66.7%)	15 (100.0%)

\*Se establece como punto de corte  $\geq 1\%$ ; <sup>#</sup>Se establece como punto de corte  $\geq 10\%$ .  
TILs: del inglés *Tumor Infiltrating Lymphocytes*.

#### 12.5. Comparación entre la tinción del PD-L1 en las células tumorales vs inmunes de las pacientes con niveles altos de *Tumor Infiltrating Lymphocytes*

También se comparó la tinción del PD-L1 en la tinción de las células tumorales y el tamaño del tumor de manera dicotómica. Se considera también el punto de corte 1% para el PD-L1 y el tamaño del tumor se separa en  $\leq 20$  cm (pT1c) y  $> 20$  cm (pT2) (Tabla 16). En este caso no se ve una relación estadísticamente significativa entre el tamaño del tumor y la expresión de PD-L1 en las células tumorales.

**Tabla 16.** Comparación entre la expresión de PD-L1 de las células tumorales y el tamaño del tumor en las 15 pacientes TILs+, no siendo estadísticamente significativo ( $p = 0.37$ ).

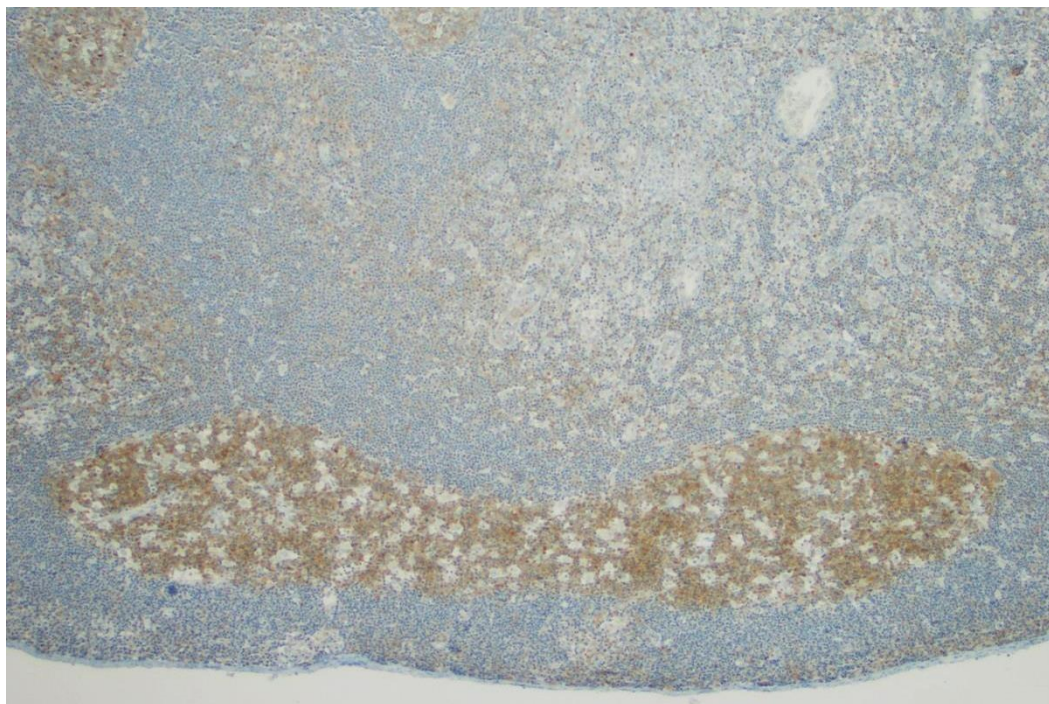
Expresión de PD-L1 en las células tumorales*	Tamaño del tumor		Total
	$\leq 20$ cm (pT1c)	$> 20$ cm (pT2)	
Negativo	4 (26.7%)	3 (20.0%)	7 (36.6%)
Positivo	2 (13.3%)	6 (40.0%)	8 (53.4%)
Total	6 (40.0%)	9 (60.0%)	15 (100.0%)

\*Se establece como punto de corte  $\geq 1\%$ .

TILs: del inglés *Tumor Infiltrating Lymphocytes*.

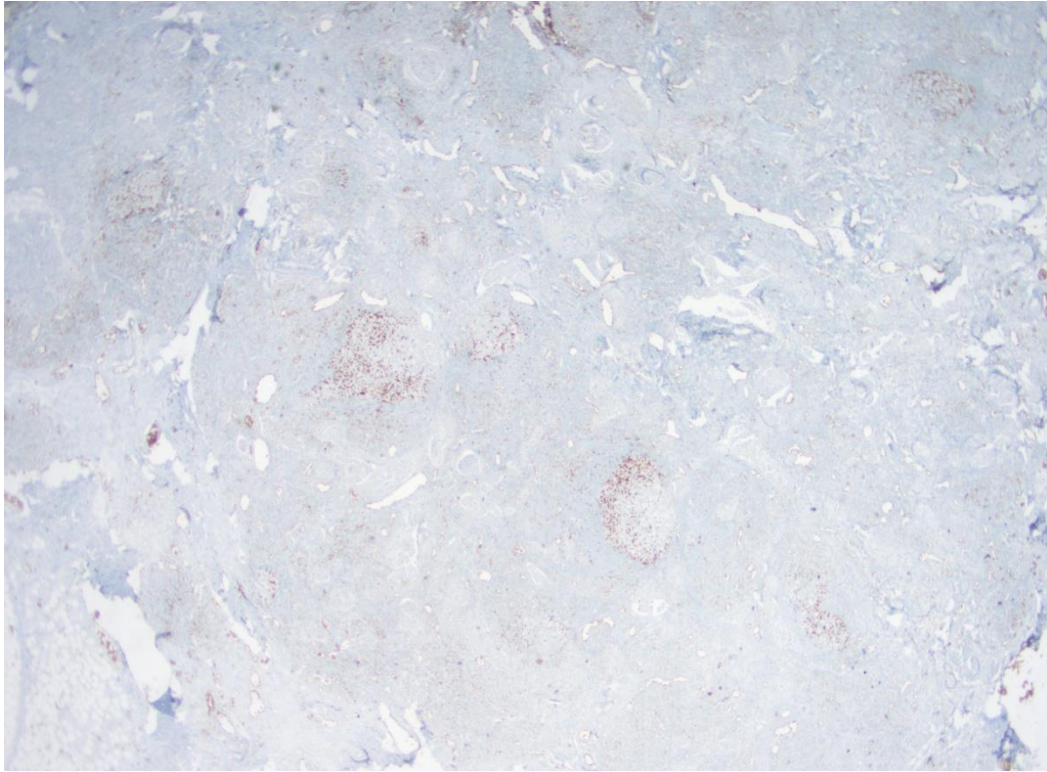
### 12.6. Comparación de los ganglios linfáticos y estructuras linfáticas terciarias entre las pacientes con niveles altos y bajos de *Tumor Infiltrating Lymphocytes*

Se hizo un análisis cualitativo y cuantitativo de los CG y de los TLS a partir de las láminas de H&E, PD-1 y OX-40, para evitar que se nos pasara algún CG o TLS. Se consideró que  $\leq 3$  CG eran una respuesta humoral pobre y  $\leq 100 \mu\text{m}$  como un CG pequeño (Foto 31) después de la observación cualitativa de todas las muestras. Se observó una tendencia a que los ganglios de las pacientes con TILs+ tenían más CG y de mayor tamaño que las pacientes con TILs- (80% vs. 35%). Sin embargo, en ambos grupos había tanto CG bien formados (circulares y simétricos, ver Foto 31) como también irregulares (Foto 41).



**Foto 41.** Tinción de OX-40 de un centro germinal irregular en una paciente TILs+ (10x).

En las muestras de tumor, se observó un mayor porcentaje de pacientes con TLS en el grupo de TILs+ que en el grupo de TILs- (47% vs. 25%). Los TLS de las pacientes TILs+ solían ser mucho más numerosos y grandes, mientras que los TLS de las TILs- eran poco numerosos –normalmente 1 o 2 a lo sumo– y pequeños. La mayoría eran extratumorales (en la periferia del tumor), pero en algunas pacientes TILs+ se encontraban dentro del área tumoral (Foto 42).

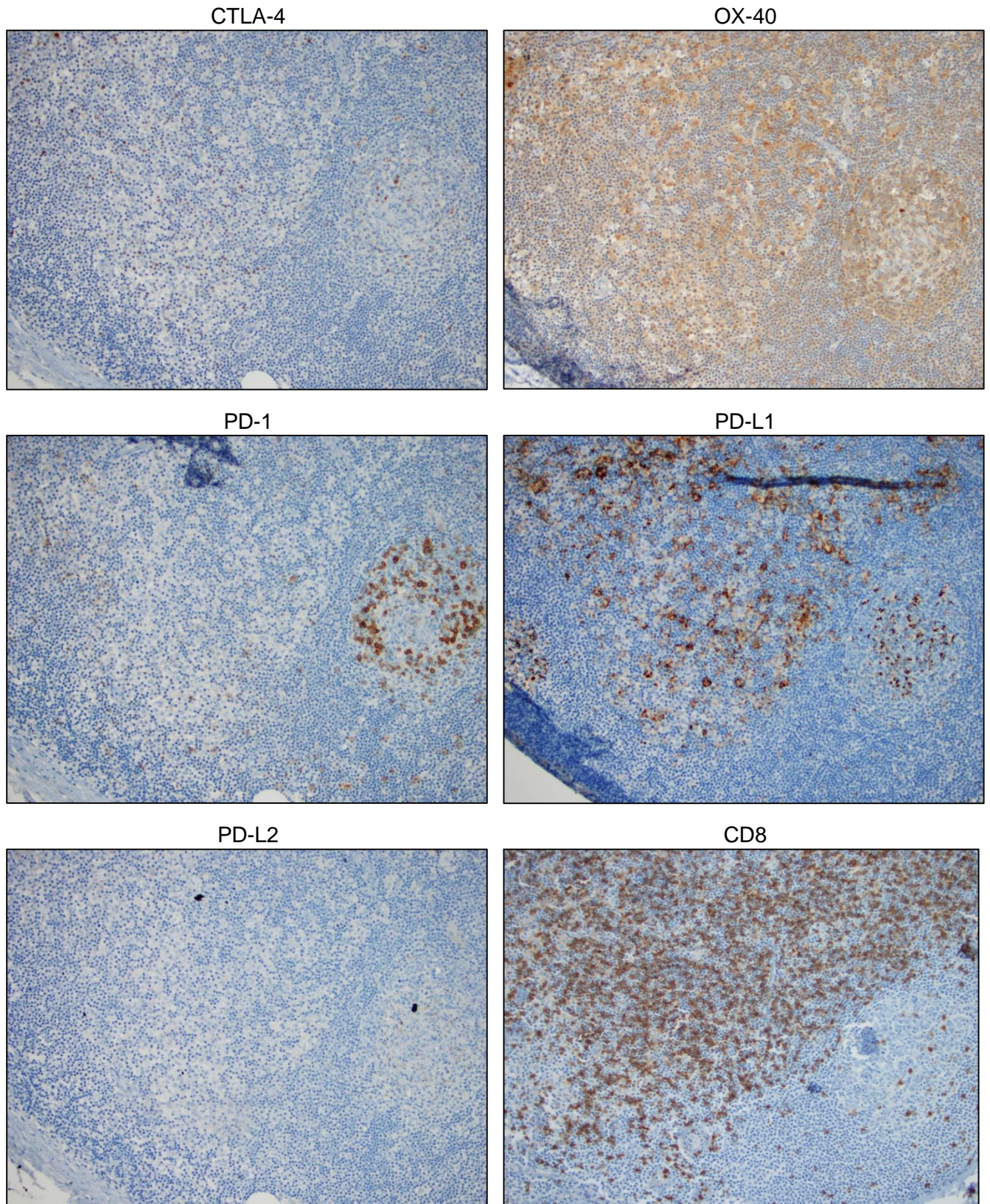


**Foto 42.** Tinción de PD-1 en los TLS dentro del área tumoral de una paciente TILs+ (4x).

### **12.7. Misma área con diferentes anticuerpos**

Se hicieron fotografías para observar las tinciones de los anticuerpos en la misma zona y las muestras elegidas se tiñeron también con CD8. En la Foto 43 se muestra el área paracortical y CG de un ganglio de una paciente TILs-. El CTLA-4 tiñe los linfocitos presentes en el área paracortical, donde también hay mucha tinción de OX-40, de PD-L1 y de CD8, poco de PD-1 y apenas del PD-L2. El CG presenta tinción central de PD-L1 y PD-L2, y tinción en el borde de OX-40, PD-1 y CTLA-4.

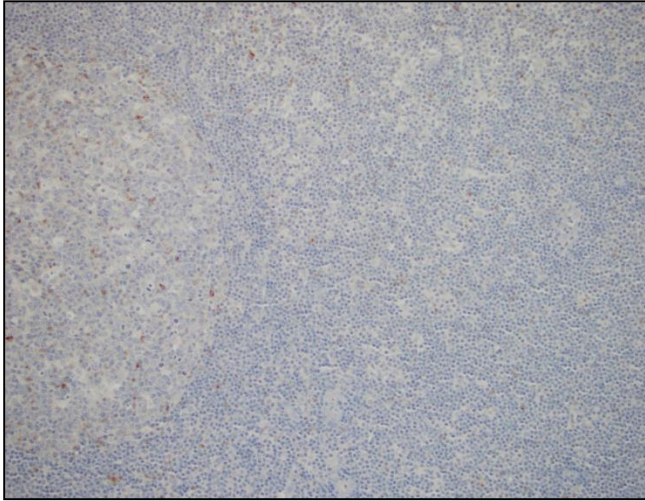
La Foto 44 muestra el área paracortical y un centro germinal de una paciente TILs+. El CTLA-4 apenas tiñe el área paracortical, pero sí que lo hace en los linfocitos del CG. El OX-40 tiene mucha tinción en el CG y un poco difuso en el paracórtex. El PD-1, PD-L1 y PD-L2 tiene tinción en el CG pero apenas en el área paracortical. La tinción de CD8 nos muestra que hay muchos linfocitos T citotóxicos en el área paracortical.



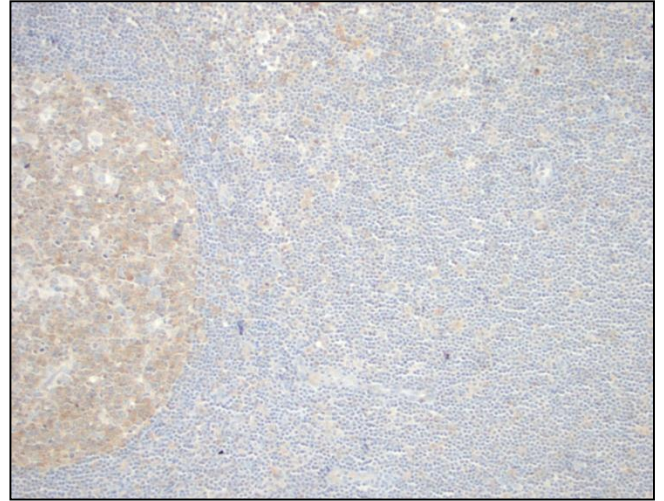
**Foto 43.** Detalle de tinción del área paracortical y centro germinal por CTLA-4, OX-40, PD-1, PD-L1, PD-L2 y CD8, en el ganglio de una paciente TILs- (20x). TILs: *Tumor Infiltrating Lymphocytes*



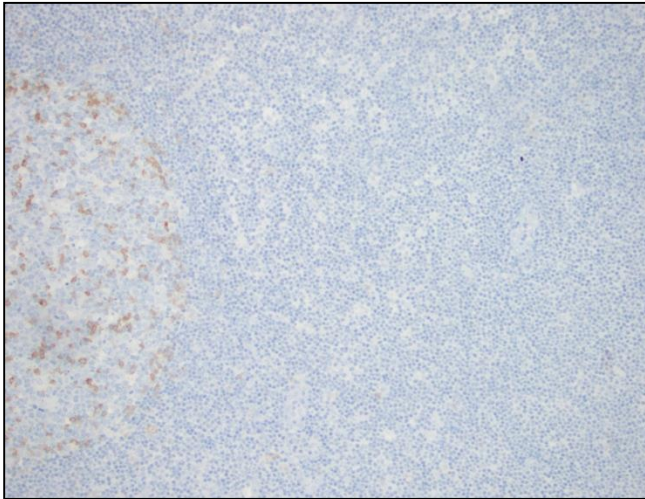
CTLA-4



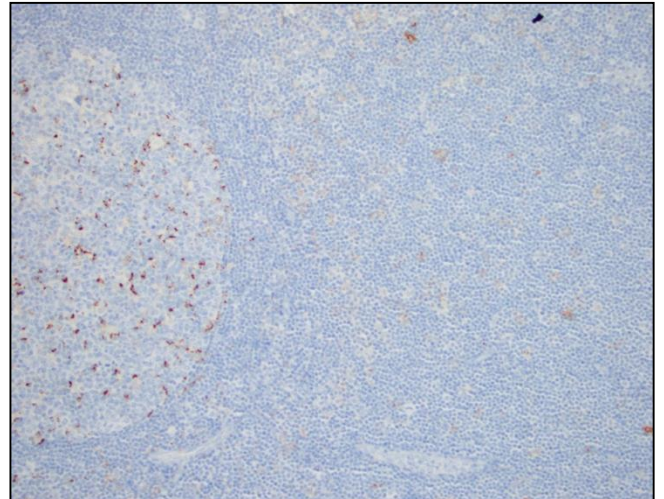
OX-40



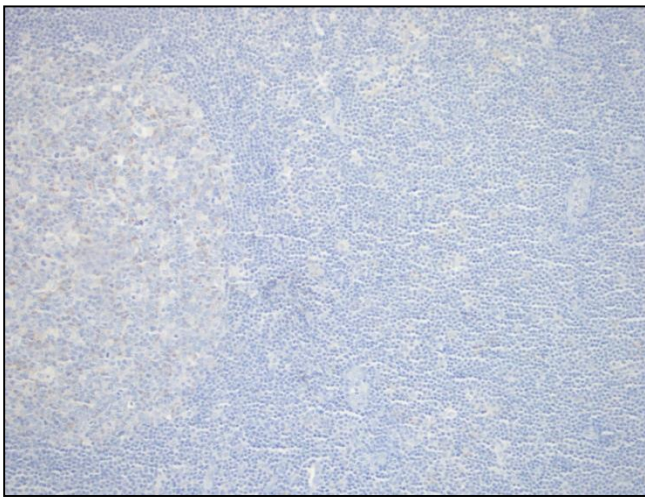
PD-1



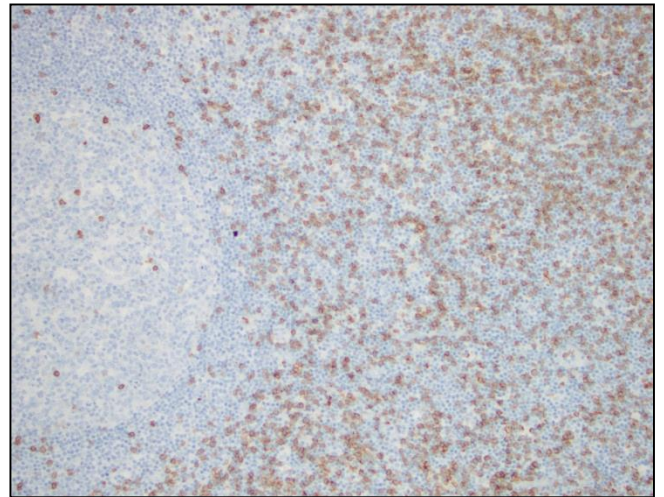
PD-L1



PD-L2

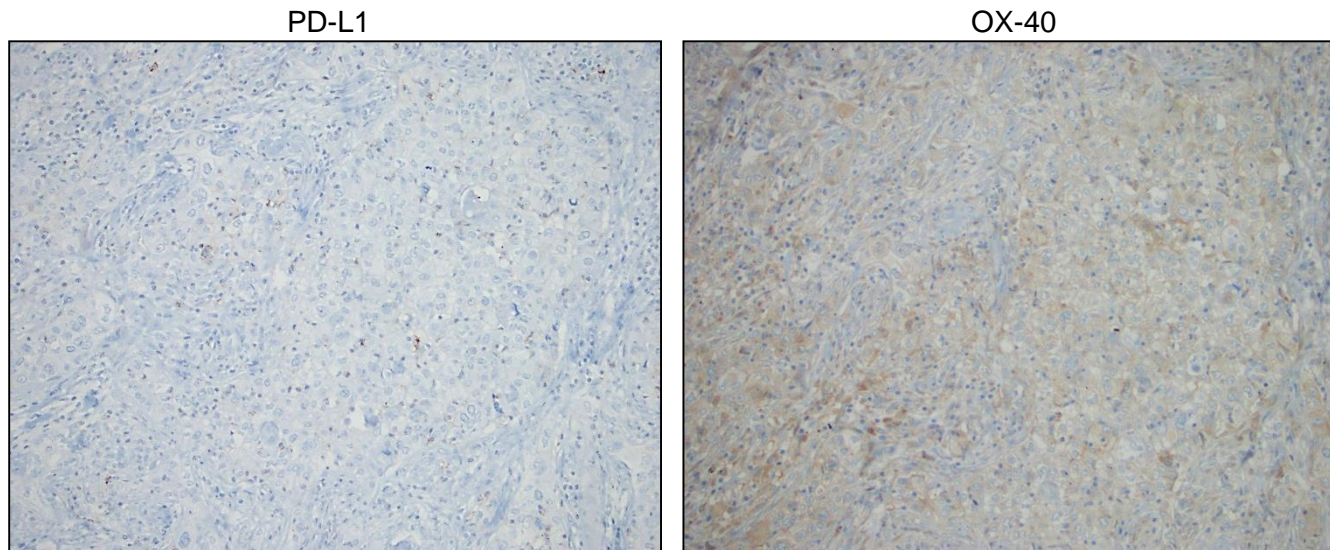


CD8



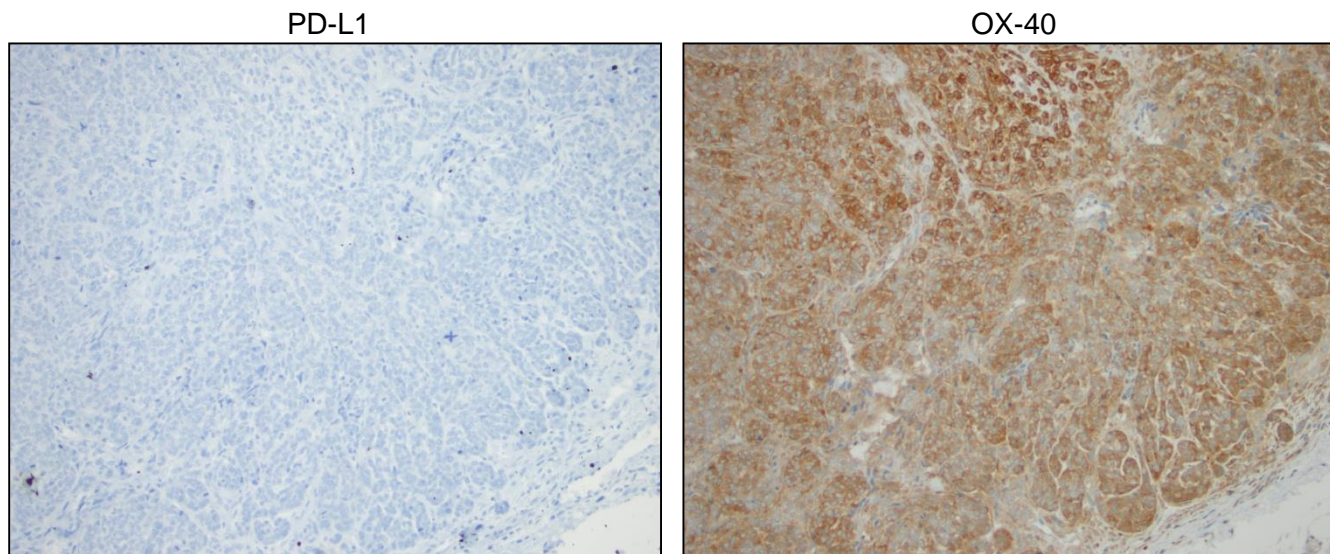
**Foto 44.** Detalle de tinción del área paracortical y un centro germinal por CTLA-4, OX-40, PD-1, PD-L1, PD-L2 y CD8, en el ganglio de una paciente TILs+ (20x). TILs: *Tumor Infiltrating Lymphocytes*.

En la Foto 45 se muestra dos fotografías de una paciente TILs+ con PD-L1+ en las células tumorales, especialmente las de la parte de arriba-derecha de la fotografía. La tinción de OX-40 es más bien citoplasmática, pero no es tan fuerte como en una paciente TILs- (Foto 46).



**Foto 45.** Tinción de PD-L1 y OX-40 en el tumor de una paciente TILs+ con células tumorales PD-L1+ (20x). TILs: *Tumor Infiltrating Lymphocytes*.

En la Foto 46 se muestra la tinción de una muestra de TILs-, donde la tinción de OX-40 en las células tumorales es muy fuerte y no hay apenas tinción de PD-L1.

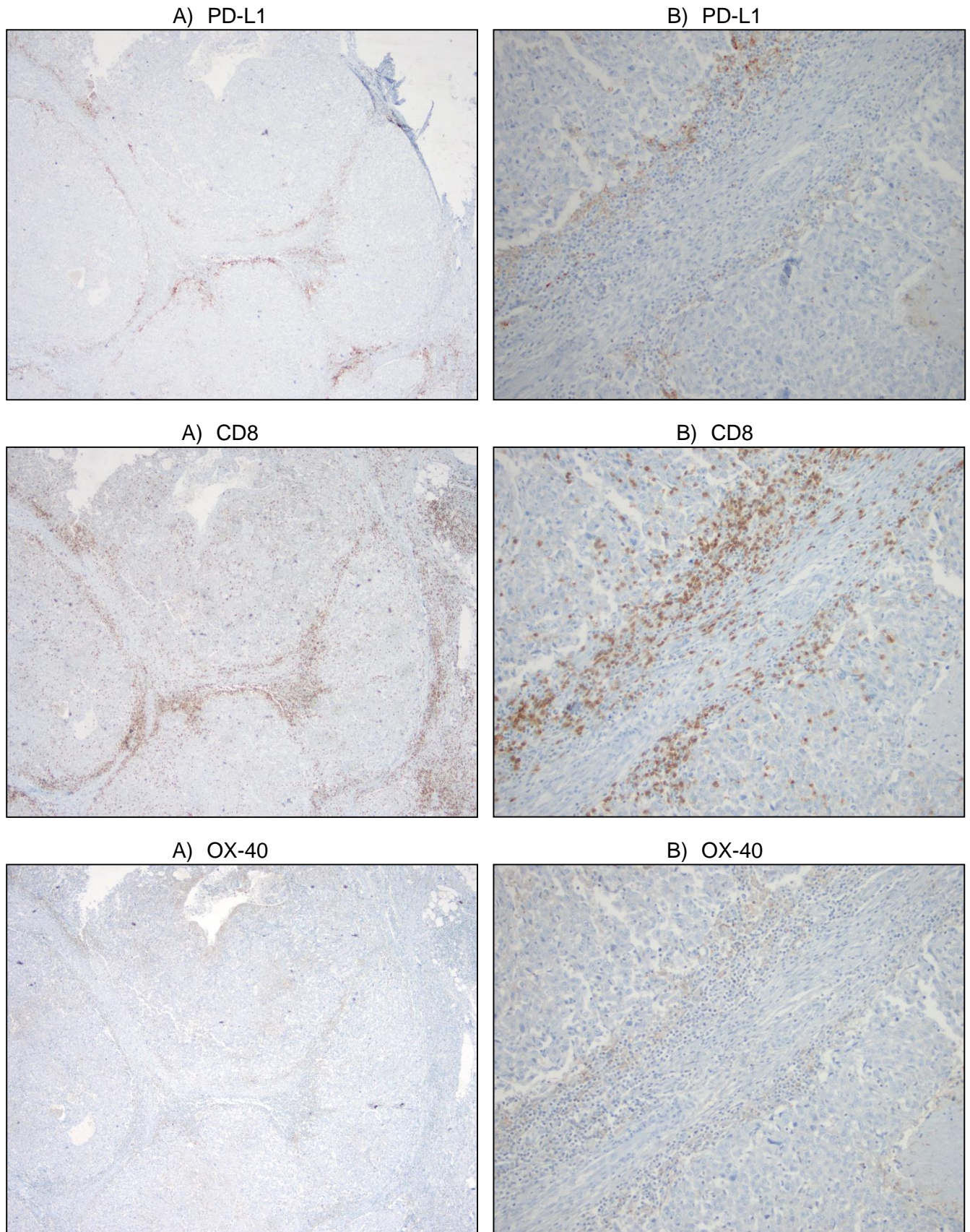


**Foto 46.** Tinción de PD-L1 y OX-40 en el tumor de una paciente TILs- con células tumorales OX-40 muy positivo (20x). TILs: *Tumor Infiltrating Lymphocytes*.

La Foto 47-A muestra las tinciones de tres anticuerpos diferentes de una paciente TILs+ cuyas TILs estromales son PD-L1+, especialmente aquellas adyacentes al tumor. Esto ocurre también con el marcador OX-40, aunque su tinción es más débil. Con el marcador CD8 vemos que la mayoría que se tiñen son también las adyacentes al tumor, y hay bastante coincidencia con la tinción de PD-L1 y OX-40. Podrían ser linfocitos T reguladores. La Foto 47-B se muestra el detalle del estroma de la misma paciente, donde se puede apreciar claramente que hay infiltración de células CD8+ intratumorales, alguna de estas son PD-L1+, y prácticamente ninguna son OX-40+.

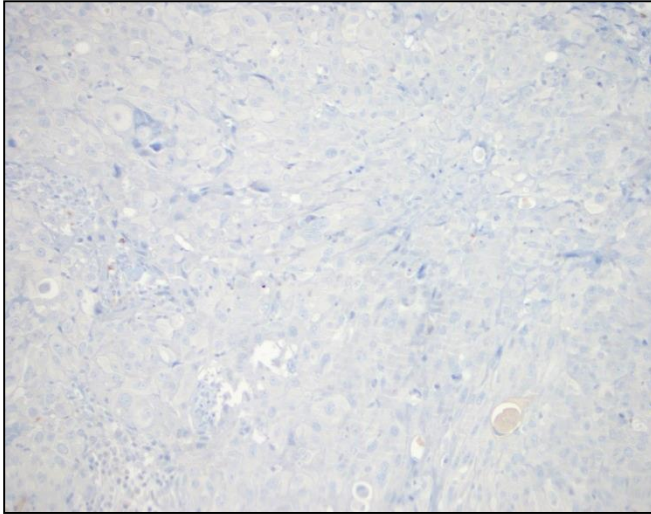
La Foto 48 es de una de las pocas pacientes TILs+ cuyas células tumorales eran PD-L2+. Su tinción era citoplasmática donde algunas células presentaban más intensidad que otras. El OX-40 presentaba una tinción moderada citoplasmática en la mayoría de las células tumorales. El PD-1 y PD-L1 teñían solo las TILs intratumorales que podrían ser células T citotóxicas según se aprecia en la tinción con CD8. El CTLA-4 tiñe escasamente alguna TIL estromal.

En la Foto 49 se muestra un TLS intratumoral de una paciente TILs+. Su tinción sigue prácticamente el mismo patrón que los CG del ganglio linfático, habiendo tinción abundante de OX-40 en casi todas las células del TILs (exceptuando los macrófagos), tinción de PD-1 fuerte de los linfocitos, tinción de PD-L1 fuerte probablemente en las CPA, tinción de PD-L2 intermedia en los linfocitos y tinción de CTLA-4 débil en los linfocitos. El marcador CD8 nos muestra que apenas hay células T citotóxicas en su interior pero si alrededor como TILs estromales, ya que es un TLS de una paciente TILs+.

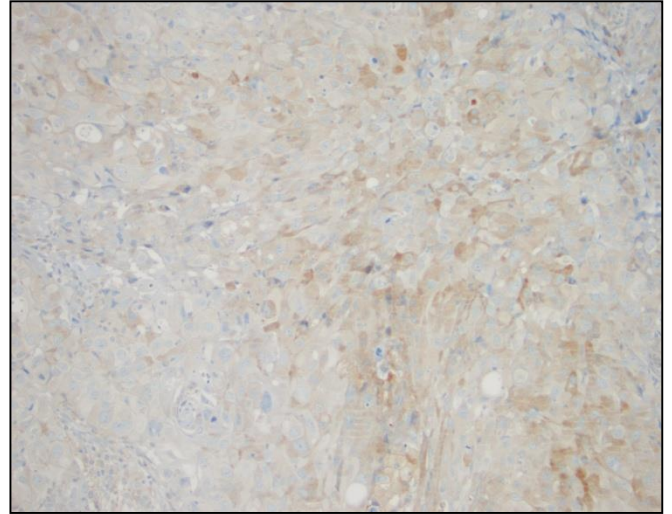


**Foto 47.** Tumor de una paciente TILs+ teñido de PD-L1, CD8 y OX-40. A) zona interna (10x); B) detalle TILs estromales (20x). TILs: *Tumor Infiltrating Lymphocytes*.

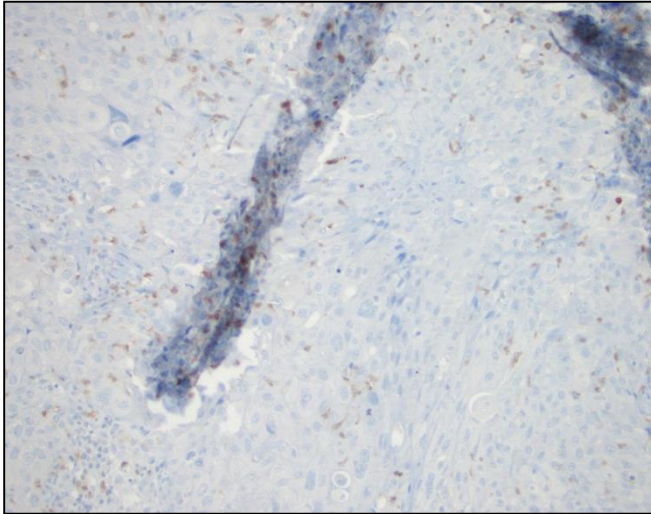
CTLA-4



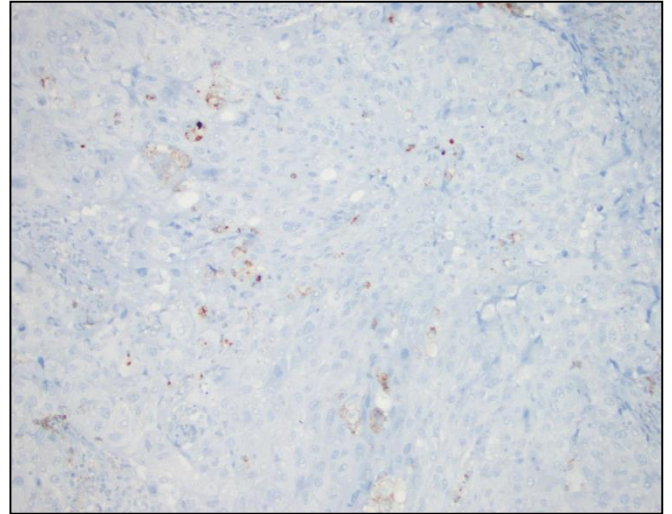
OX-40



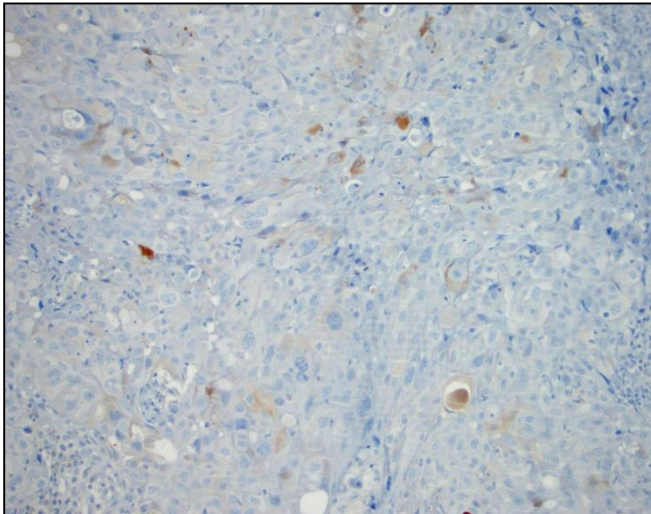
PD-1



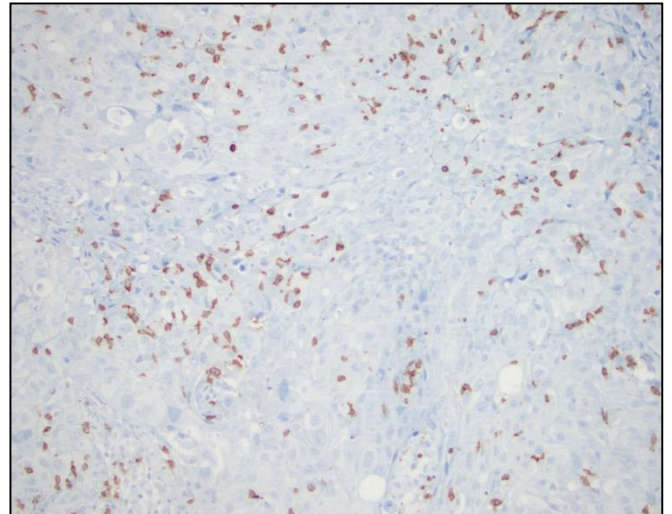
PD-L1



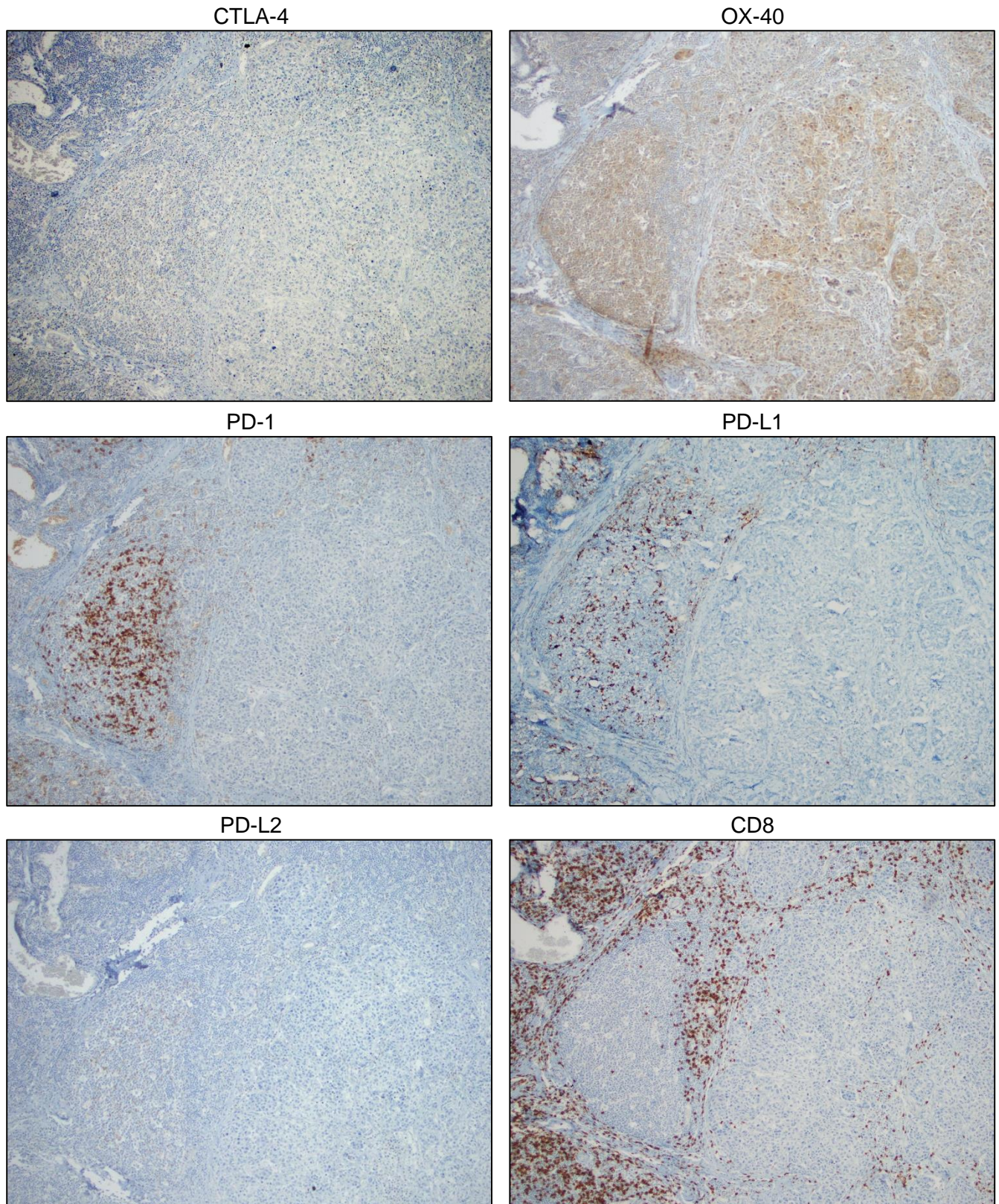
PD-L2



CD8



**Foto 48.** Tinción en el tumor de una paciente TILs+ con células tumorales PD-L2+ por CTLA-4, OX-40, PD-1, PD-L1, PD-L2 y CD8 (20x). TILs: *Tumor Infiltrating Lymphocytes*.



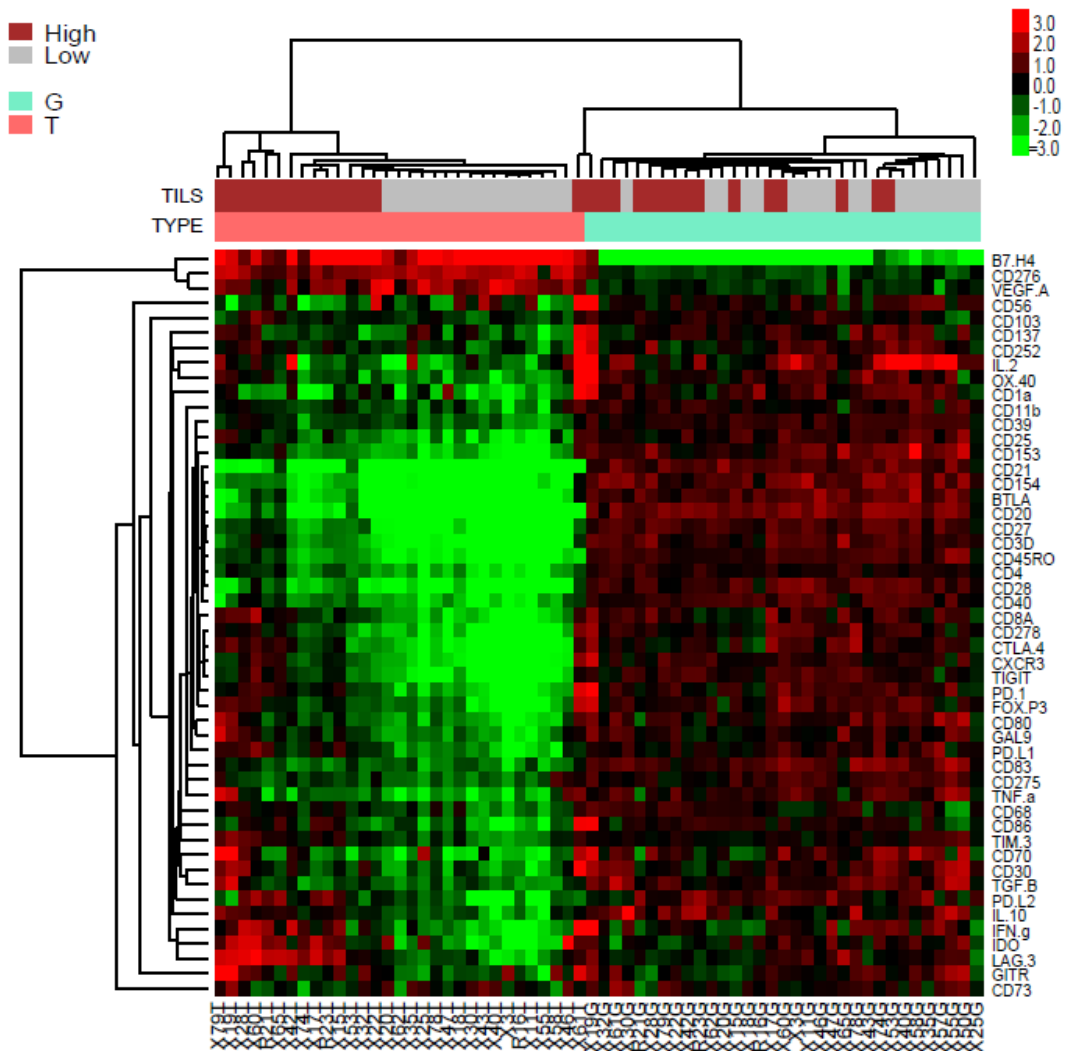
**Foto 49.** Detalle de tinción un TLS interno (izquierda) por CTLA-4, OX-40, PD-1, PD-L1, PD-L2 y CD8, en el tumor de una paciente TILs+ (10x). TLS: Tertiary Lymphoid Structure; TILs: *Tumor Infiltrating Lymphocytes*.

### **13. Expresión génica inmune**

La técnica NanoString nos permitió conocer la expresión de 50 genes relacionados con la respuesta inmune tanto en el tumor como en el ganglio. Al realizar el control de calidad de los datos crudos obtenidos, de las 35 muestras de cada tipo, se tuvieron que descartar los resultados de cuatro muestras de tumor y dos muestras de ganglio TILs-, siendo en total 31 tumores (15 TILs+ y 16 TILs-) y 33 ganglios (15 TILs+ y 18 TILs-). El control de calidad viene definido por en el software del vendedor y consiste en revisar las imágenes obtenidas, la densidad de unión de los *probes*, la linealidad del control positivo, el límite de detección y el ruido de fondo.

#### **13.1. Comparación entre el tumor y los ganglios de los dos grupos**

Se hizo un análisis global de los tumores y de los ganglios juntos, y la separación entre ellos fue bastante clara, aunque hay una muestra de tumor TILs+ (61T) que se agrupa con los ganglios ya que la expresión se parece a un ganglio de TILs+ (19G) (Figura 40). Dentro de las muestras de tumor, éstas se separan en los grupos TILs+ y TILs-, hecho que no ocurre en el ganglio. Se observa también que la mayoría de los genes (47 de 50 genes) estaban más expresados en el ganglio que en el tumor (3 de 50 genes), como era de esperar al ser genes del sistema inmune. El gen más expresado en el tumor con respecto al ganglio es el B7.H4 y los que menos el CD21 y CD20 (ambos muy parecidos).



**Figura 40.** Heatmap de todas las muestras de tumor (T, en rojo) y ganglio (G, en verde), clasificadas por TILs+ (high en marrón) y TILs- (low, en gris). TILs: del inglés *Tumor Infiltrating Lymphocytes*.

Por un análisis no supervisado, se vieron tres genes que estaban más expresados en el tumor que en el ganglio: B7.H4, CD276 (B7.H3) y VEGF.A (Figura 40). Se hicieron también análisis SAM comparando parejas tumor-ganglio (Tabla 17), y comparaciones dentro de cada grupo (Tabla 18 y Tabla 19).



**Tabla 17.** Análisis comparativo pareado tumor-ganglio del tumor vs. ganglio. Genes más y menos regulados en el tumor ordenados según el *t score*. Un valor de *q-value* < 5 es estadísticamente significativo.

<b>Gen</b>	<b><i>t score</i>(d)</b>	<b><i>Fold Change</i></b>	<b><i>q-value</i> (%)</b>	<b>Gen</b>	<b><i>t score</i>(d)</b>	<b><i>Fold Change</i></b>	<b><i>q-value</i> (%)</b>
<b>B7.H4</b>	14.13	240.49	0	<b>PD.1</b>	-4.14	0.27	0
<b>CD276</b>	9.60	5.18	0	<b>FOX.P3</b>	-4.13	0.28	0
<b>VEGF.A</b>	6.14	3.73	0	<b>CD8A</b>	-4.08	0.29	0
<b>LAG.3</b>	0.13	1.04	0	<b>CD1a</b>	-4.07	0.24	0
<b>CD21</b>	-12.68	0.01	0	<b>TNF.a</b>	-4.03	0.27	0
<b>CD20</b>	-10.54	0.02	0	<b>OX.40</b>	-3.71	0.34	0
<b>CD154</b>	-9.92	0.05	0	<b>PD.L2</b>	-3.65	0.33	0
<b>CD28</b>	-9.58	0.08	0	<b>CD11b</b>	-3.55	0.46	0
<b>BTLA</b>	-9.12	0.05	0	<b>GAL9</b>	-3.48	0.42	0
<b>CD45RO</b>	-8.15	0.11	0	<b>IL.2</b>	-3.26	0.29	0
<b>CD27</b>	-7.72	0.08	0	<b>PD.L1</b>	-3.21	0.42	0
<b>CD40</b>	-7.61	0.17	0	<b>IL.10</b>	-3.11	0.43	0
<b>CD3D</b>	-7.60	0.08	0	<b>CD86</b>	-3.07	0.39	0
<b>CD4</b>	-6.98	0.23	0	<b>CD68</b>	-2.99	0.59	0
<b>CD153</b>	-6.85	0.16	0	<b>CD70</b>	-2.97	0.37	0
<b>CD83</b>	-6.76	0.24	0	<b>CD30</b>	-2.77	0.46	0
<b>CD278</b>	-5.25	0.18	0	<b>CD137</b>	-2.73	0.48	0
<b>TIGIT</b>	-5.13	0.16	0	<b>CD103</b>	-2.06	0.68	0
<b>CD39</b>	-5.04	0.37	0	<b>CD56</b>	-1.85	0.53	0
<b>CXCR3</b>	-4.98	0.18	0	<b>CD252</b>	-1.77	0.64	0
<b>TGF.B</b>	-4.73	0.33	0	<b>TIM.3</b>	-1.56	0.71	0
<b>CTLA.4</b>	-4.69	0.18	0	<b>IFN.g</b>	-1.33	0.59	0
<b>CD25</b>	-4.67	0.25	0	<b>CD73</b>	-1.01	0.79	0
<b>CD80</b>	-4.55	0.30	0	<b>IDO</b>	-0.95	0.67	0
<b>CD275</b>	-4.43	0.41	0	<b>GITR</b>	-0.24	0.93	0

Ir al listado de abreviaturas para el significado de cada gen.

**Tabla 18.** Análisis comparativo solo en las pacientes TILs- del tumor vs. ganglio. Genes más y menos regulados en el tumor ordenados según el *t score*. Un valor de *q-value* < 5 es estadísticamente significativo.

<b>Gen</b>	<b><i>t score</i>(d)</b>	<b><i>Fold Change</i></b>	<b><i>q-value</i> (%)</b>	<b>Gen</b>	<b><i>t score</i>(d)</b>	<b><i>Fold Change</i></b>	<b><i>q-value</i> (%)</b>
<b>B7.H4</b>	14.42	321.05	0.00	<b>CD39</b>	-5.55	0.28	0.00
<b>CD276</b>	7.62	5.74	0.00	<b>PD.L1</b>	-5.41	0.21	0.00
<b>VEGF.A</b>	5.53	4.77	0.00	<b>TGF.B</b>	-5.33	0.26	0.00
<b>CD21</b>	-16.12	0.00	0.00	<b>FOX.P3</b>	-5.27	0.13	0.00
<b>CD20</b>	-11.77	0.01	0.00	<b>TNF.a</b>	-4.81	0.14	0.00
<b>CD154</b>	-11.41	0.02	0.00	<b>IL.2</b>	-4.72	0.17	0.00
<b>CD28</b>	-11.28	0.04	0.00	<b>GAL9</b>	-4.71	0.26	0.00
<b>BTLA</b>	-10.80	0.02	0.00	<b>CD275</b>	-4.57	0.34	0.00
<b>CD27</b>	-10.26	0.03	0.00	<b>CD86</b>	-4.54	0.23	0.00
<b>CD45RO</b>	-9.62	0.05	0.00	<b>CD30</b>	-4.32	0.26	0.00
<b>CD3D</b>	-9.26	0.03	0.00	<b>IFN.g</b>	-3.98	0.22	0.00
<b>CD40</b>	-9.23	0.11	0.00	<b>CD1a</b>	-3.96	0.18	0.00
<b>CD4</b>	-8.10	0.15	0.00	<b>CD11b</b>	-3.88	0.32	0.00
<b>CXCR3</b>	-7.49	0.07	0.00	<b>TIM.3</b>	-3.73	0.42	0.00
<b>CD153</b>	-7.46	0.09	0.00	<b>CD70</b>	-3.72	0.22	0.00
<b>TIGIT</b>	-7.26	0.06	0.00	<b>IL.10</b>	-3.54	0.27	0.00
<b>CTLA.4</b>	-7.17	0.06	0.00	<b>CD68</b>	-3.18	0.49	0.00
<b>CD278</b>	-6.77	0.07	0.00	<b>LAG.3</b>	-2.85	0.38	0.00
<b>PD.1</b>	-6.61	0.12	0.00	<b>CD252</b>	-2.59	0.48	0.00
<b>CD80</b>	-6.55	0.16	0.00	<b>IDO</b>	-2.52	0.24	0.00
<b>CD25</b>	-6.22	0.12	0.00	<b>CD137</b>	-2.51	0.42	0.00
<b>CD83</b>	-5.96	0.19	0.00	<b>CD103</b>	-2.48	0.58	0.00
<b>CD8A</b>	-5.93	0.14	0.00	<b>GITR</b>	-1.86	0.51	0.00
<b>OX.40</b>	-5.78	0.21	0.00	<b>CD56</b>	-1.56	0.55	0.00
<b>PD.L2</b>	-5.56	0.14	0.00	<b>CD73</b>	-0.40	0.87	0.00

Ir al listado de abreviaturas para el significado de cada gen

TILs: del inglés *Tumor Infiltrating Lymphocytes*

**Tabla 19.** Análisis comparativo solo en las pacientes TILs+ del tumor vs. ganglio. Genes más y menos regulados en el tumor ordenados según el *t score*. Un valor de *q-value* < 5 es estadísticamente significativo.

<b>Gen</b>	<b><i>t score</i>(d)</b>	<b><i>Fold Change</i></b>	<b><i>q-value</i> (%)</b>	<b>Gen</b>	<b><i>t score</i>(d)</b>	<b><i>Fold Change</i></b>	<b><i>q-value</i> (%)</b>
<b>B7.H4</b>	7.99	176.70	0.00	<b>CD1a</b>	-2.12	0.34	0.00
<b>CD276</b>	6.97	4.64	0.00	<b>CD25</b>	-1.94	0.56	0.00
<b>VEGF.A</b>	3.89	2.86	0.00	<b>CXCR3</b>	-1.92	0.54	0.00
<b>LAG.3</b>	3.55	3.05	0.00	<b>CD80</b>	-1.73	0.59	0.00
<b>IDO</b>	2.27	2.07	0.00	<b>CD11b</b>	-1.66	0.67	0.00
<b>GITR</b>	1.42	1.77	0.26	<b>CTLA.4</b>	-1.64	0.59	0.00
<b>IFN.g</b>	0.98	1.68	0.75	<b>TNF.a</b>	-1.58	0.53	0.00
<b>TIM.3</b>	0.83	1.23	0.97	<b>FOX.P3</b>	-1.57	0.62	0.00
<b>CD21</b>	-7.44	0.03	0.00	<b>CD137</b>	-1.52	0.56	0.00
<b>CD20</b>	-7.42	0.06	0.00	<b>CD68</b>	-1.45	0.72	0.00
<b>CD154</b>	-6.75	0.12	0.00	<b>CD8A</b>	-1.27	0.67	0.00
<b>CD28</b>	-6.68	0.16	0.00	<b>CD56</b>	-1.21	0.51	0.00
<b>BTLA</b>	-6.47	0.13	0.00	<b>OX.40</b>	-1.20	0.60	0.00
<b>CD3D</b>	-5.80	0.23	0.00	<b>CD73</b>	-1.18	0.71	0.00
<b>CD45RO</b>	-5.34	0.23	0.00	<b>IL.10</b>	-1.16	0.72	0.00
<b>CD27</b>	-5.08	0.23	0.00	<b>PD.1</b>	-1.15	0.67	0.00
<b>CD83</b>	-4.46	0.31	0.00	<b>GAL9</b>	-1.12	0.70	0.00
<b>CD153</b>	-4.37	0.31	0.00	<b>IL.2</b>	-1.12	0.50	0.00
<b>CD40</b>	-4.27	0.28	0.00	<b>CD70</b>	-0.94	0.65	0.00
<b>CD4</b>	-4.13	0.36	0.00	<b>PD.L2</b>	-0.81	0.79	0.00
<b>CD39</b>	-2.69	0.51	0.00	<b>CD86</b>	-0.81	0.70	0.00
<b>CD278</b>	-2.54	0.46	0.00	<b>CD103</b>	-0.78	0.82	0.00
<b>TIGIT</b>	-2.39	0.51	0.00	<b>CD30</b>	-0.45	0.85	0.00
<b>CD275</b>	-2.37	0.51	0.00	<b>PD.L1</b>	-0.40	0.90	0.00
<b>TGF.B</b>	-2.36	0.44	0.00	<b>CD252</b>	-0.36	0.87	0.00

Ir al listado de abreviaturas para el significado de cada gen

TILs: del inglés *Tumor Infiltrating Lymphocytes*

Al comparar los resultados, se vieron que eran bastante parecidos al análisis no supervisado de todas las muestras, excepto en el análisis dentro del grupo TILs+, que salieron cinco genes más expresados en el tumor (LAG3, IDO, GITR, INF- $\gamma$  y TIM3) (Tabla 20). Estos genes muy posiblemente están expresados en los linfocitos T, donde el LAG3, IDO y TIM3 son marcadores de inactivación y el GITR e INF- $\gamma$  son marcadores de activación (Figura 41).

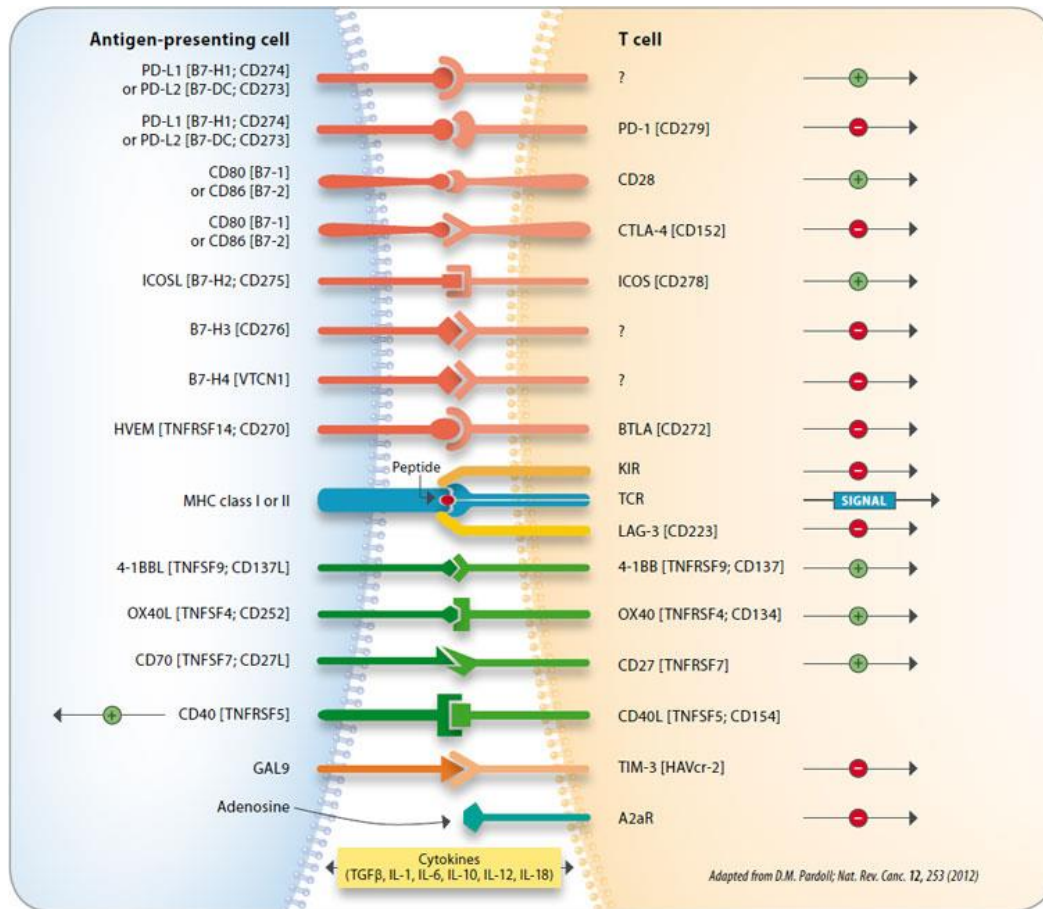
**Tabla 20.** Genes más expresados en el tumor comparado con el ganglio y su *score*. El análisis se hizo comparando los tumores y los ganglios en todas las muestras, por parejas tumor-ganglio, solo en pacientes TILs- y solo en pacientes TILs+.

Análisis no supervisado	Parejas tumor-ganglio		TILs-		TILs+	
	Gen	<i>t score</i>	Gen	<i>t score</i>	Gen	<i>t score</i>
B7.H4	B7.H4	14.13	B7.H4	14.42	B7.H4	7.99
CD276	CD276	9.60	CD276	7.62	CD276	6.97
VEGF.A	VEGF.A	6.14	VEGF.A	5.53	VEGF.A	3.89
	LAG3	0.13			LAG3	3.55
					IDO	2.27
					GITR	1.42
					IFN- $\gamma$	0.98
					TIM3	0.83

TILs: del inglés *Tumor Infiltrating Lymphocytes*; *t score*: proporción entre la diferencia entre dos grupos y las diferencias dentro de los grupos.

Ir al listado de abreviaturas para el significado de cada gen

También se pudo distinguir un grupo de genes que están claramente menos expresados en el tumor independientemente si tiene TILs o no, y más expresados en el ganglio: CD21, CD154, BTLA, CD20, CD27, CD3D, CD45RO, CD4, CD28 y CD40 (Figura 40). La mayoría de estos genes están relacionados con los linfocitos B y Th. Solo el CD27 y CD28, que son marcadores de activación, estarían relacionados con los linfocitos T citotóxicos (Figura 41). El análisis por parejas o por grupos dio los mismos resultados (variaba el orden de algunos de estos genes según el *t score*), y el CD21 y CD20 seguían siendo los más expresados.



**Figura 41.** Marcadores de activación e inhibición de linfocitos T y sus correspondientes ligandos expresados en las células presentadoras de antígenos. Ir al listado de abreviaturas para el significado de cada gen.

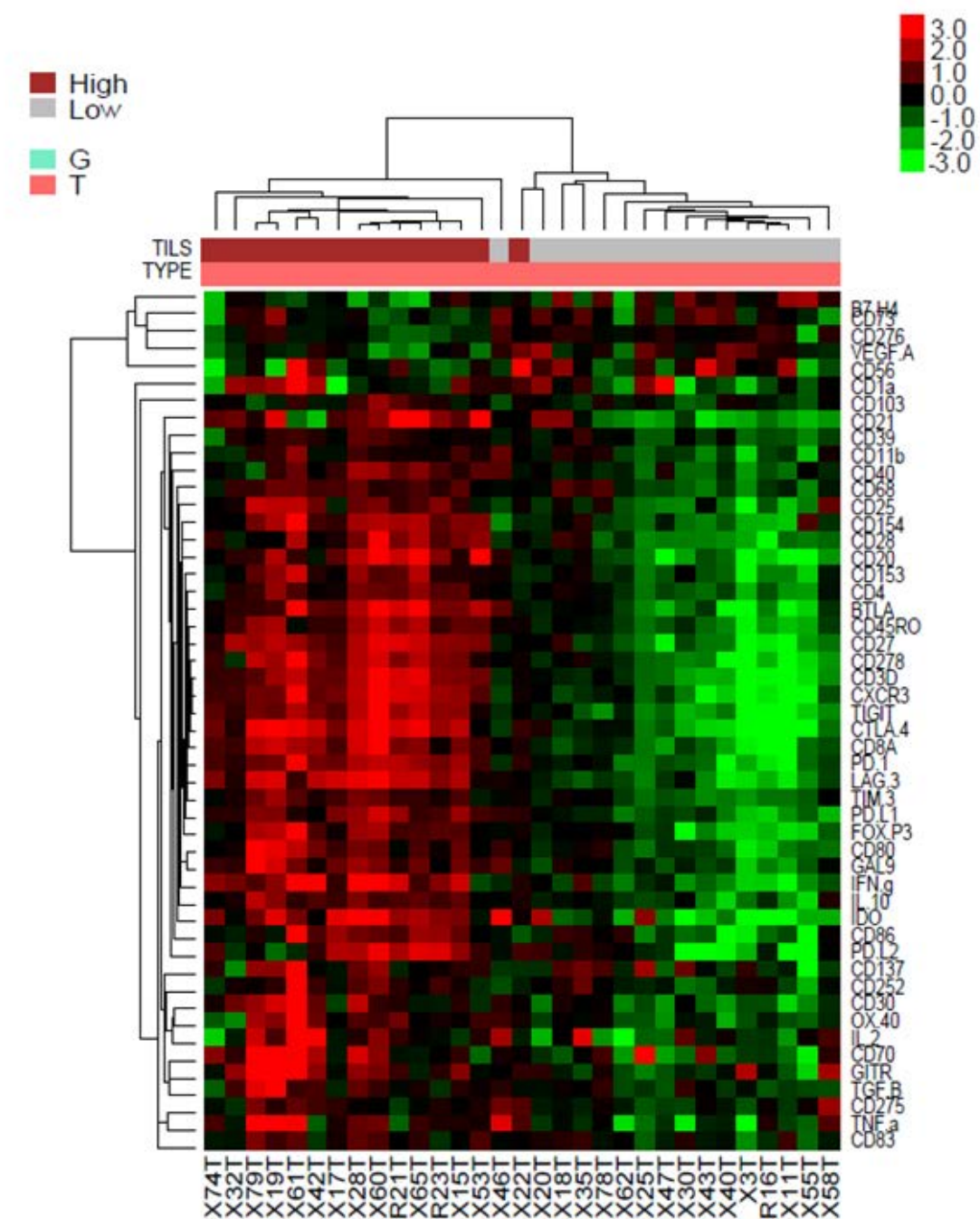
Fuente: adaptado de M Pardoll<sup>88</sup>.

### 13.2. Comparación del tumor entre las pacientes con niveles altos y bajos de *Tumor Infiltrating Lymphocytes*

Se hizo un análisis para comparar la expresión de los 50 genes en el tumor entre las pacientes TILs+ y TILs-. La separación entre las paciente TILs+ y TILs- fue prácticamente perfecta a excepción de dos muestras que se intercambian en el medio de la gráfica. La muestra de TILs+ que se clasifica junto con el resto de muestras de TILs- era la que menos TILs tenía de todas (55%).

Se observó que la mayoría de los genes estaban altamente expresados en las pacientes TILs+ (Figura 42). Por el análisis SAM se vieron cinco genes que están más expresados en los tumores TILs- (B7.H4, VEGF.A, CD276, CD73, y CD56) y eran estadísticamente significativos (Tabla 21). Cuando se compararon estos genes de manera individual mediante un análisis ANOVA, algunos seguían siendo estadísticamente significativos (B7.H4,  $p = 0.0195$ ; VEGF.A,  $p = 0.0155$ ; y CD276,  $p = 0.0361$ ) –los mismos que estaban más expresados en los tumores con respecto al ganglio

(Figura 40)- y otros no (CD73,  $p = 0.319$ ; y CD56,  $p = 0.776$ ) (Figura 43A). El resto de genes, estaban más expresados en las pacientes TILs+, siendo estadísticamente significativos 45/45 por el análisis SAM (Tabla 21) y 41/45 por ANOVA (Figura 43B). El CTLA-4 era el más expresado por SAM, y se ve una cierta tendencia a que los receptores inmunes protumorales estén más expresados que los antitumorales (Tabla 21).



**Figura 42.** Heatmap de todas las muestras de tumor, clasificadas por TILs+ (high en marrón) y TILs- (low, en gris). T: tumor; G: ganglio; TILs: del inglés *Tumor Infiltrating Lymphocytes*.

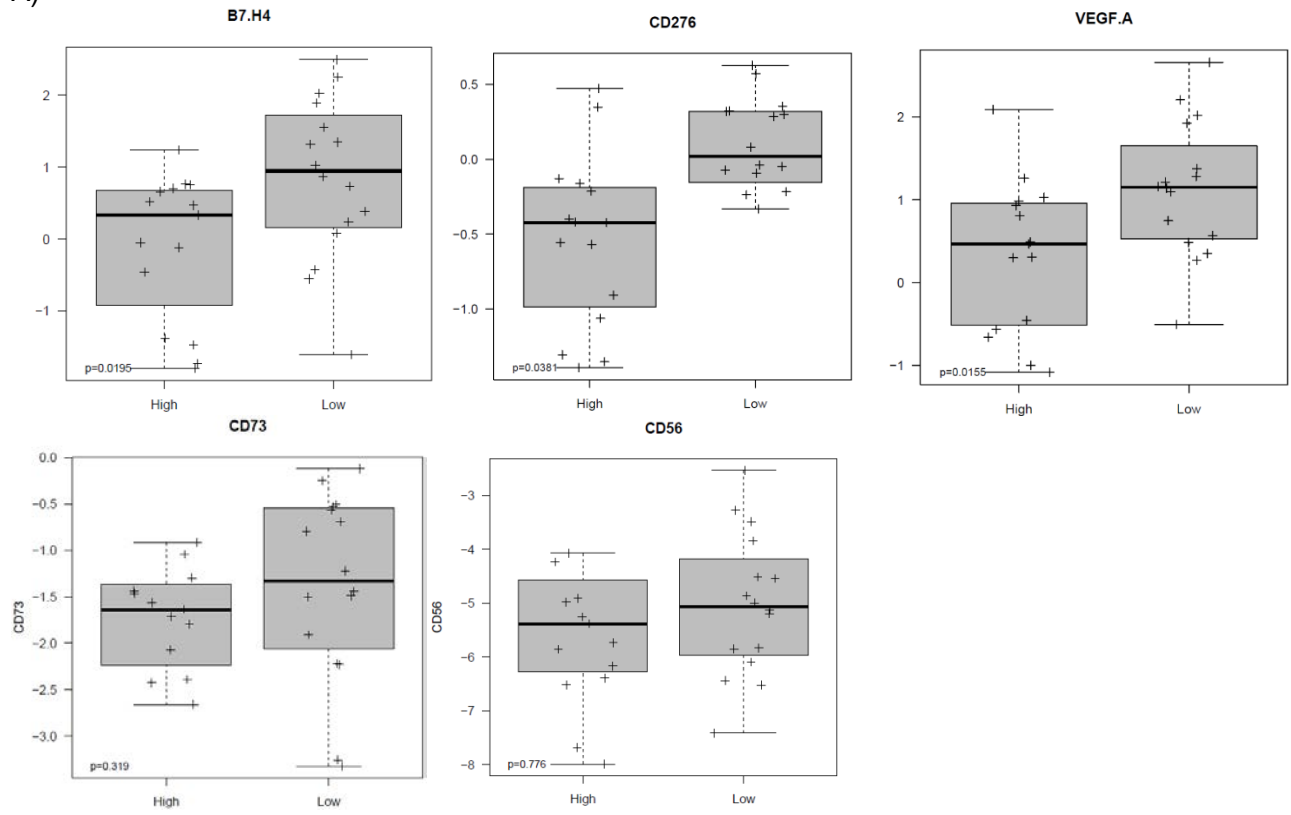
**Tabla 21.** Análisis comparativo del tumor en pacientes TILs+ vs. TILs-. Genes más y menos regulados en el tumor de pacientes TILs+ ordenados según el *t score*. Un valor de *q-value* < 5 es estadísticamente significativo.

Gen	<i>t score</i> (d)	<i>Fold Change</i>	<i>q-value</i> (%)	Gen	<i>t score</i> (d)	<i>Fold Change</i>	<i>q-value</i> (%)
<b>CTLA.4</b>	5.42	13.00	0	<b>PD.L2</b>	3.02	4.70	0
<b>LAG.3</b>	5.16	8.37	0	<b>CD153</b>	3.00	3.27	0
<b>CD27</b>	5.13	8.77	0	<b>CD30</b>	2.78	3.29	0
<b>CD3D</b>	4.98	9.77	0	<b>CD86</b>	2.68	3.60	0
<b>CXCR3</b>	4.94	10.26	0	<b>CD68</b>	2.32	2.14	0
<b>TIGIT</b>	4.92	9.56	0	<b>GITR</b>	2.31	3.10	0
<b>PD.1</b>	4.84	7.20	0	<b>CD40</b>	2.27	2.26	0
<b>CD8A</b>	4.80	7.20	0	<b>OX.40</b>	2.12	2.65	0
<b>CD278</b>	4.46	7.44	0	<b>CD70</b>	2.10	3.57	0
<b>IFN.g</b>	4.33	8.24	0	<b>TNF.a</b>	2.10	3.03	0
<b>BTLA</b>	4.16	7.12	0	<b>CD39</b>	1.77	1.73	0
<b>CD20</b>	4.06	8.44	0	<b>CD11b</b>	1.65	1.83	0
<b>PD.L1</b>	4.04	4.29	0	<b>TGF.B</b>	1.60	1.87	0
<b>CD45RO</b>	4.00	4.43	0	<b>CD252</b>	1.52	1.81	0
<b>CD154</b>	3.90	4.76	0	<b>IL.2</b>	1.37	2.40	0
<b>CD28</b>	3.71	4.31	0	<b>CD103</b>	1.27	1.48	0
<b>FOX.P3</b>	3.66	5.12	0	<b>CD83</b>	1.19	1.47	0
<b>IDO</b>	3.28	7.58	0	<b>CD137</b>	1.02	1.62	0
<b>TIM.3</b>	3.25	2.82	0	<b>CD275</b>	0.89	1.34	0
<b>IL.10</b>	3.23	3.12	0	<b>CD1a</b>	0.82	1.66	0
<b>CD80</b>	3.20	3.69	0	<b>B7.H4</b>	-1.55	0.52	0
<b>CD21</b>	3.11	5.74	0	<b>VEGF.A</b>	-1.48	0.58	0
<b>GAL9</b>	3.10	3.44	0	<b>CD276</b>	-1.09	0.71	0.16
<b>CD25</b>	3.08	4.01	0	<b>CD73</b>	-0.60	0.79	0.16
<b>CD4</b>	3.02	2.81	0	<b>CD56</b>	-0.21	0.89	0.16

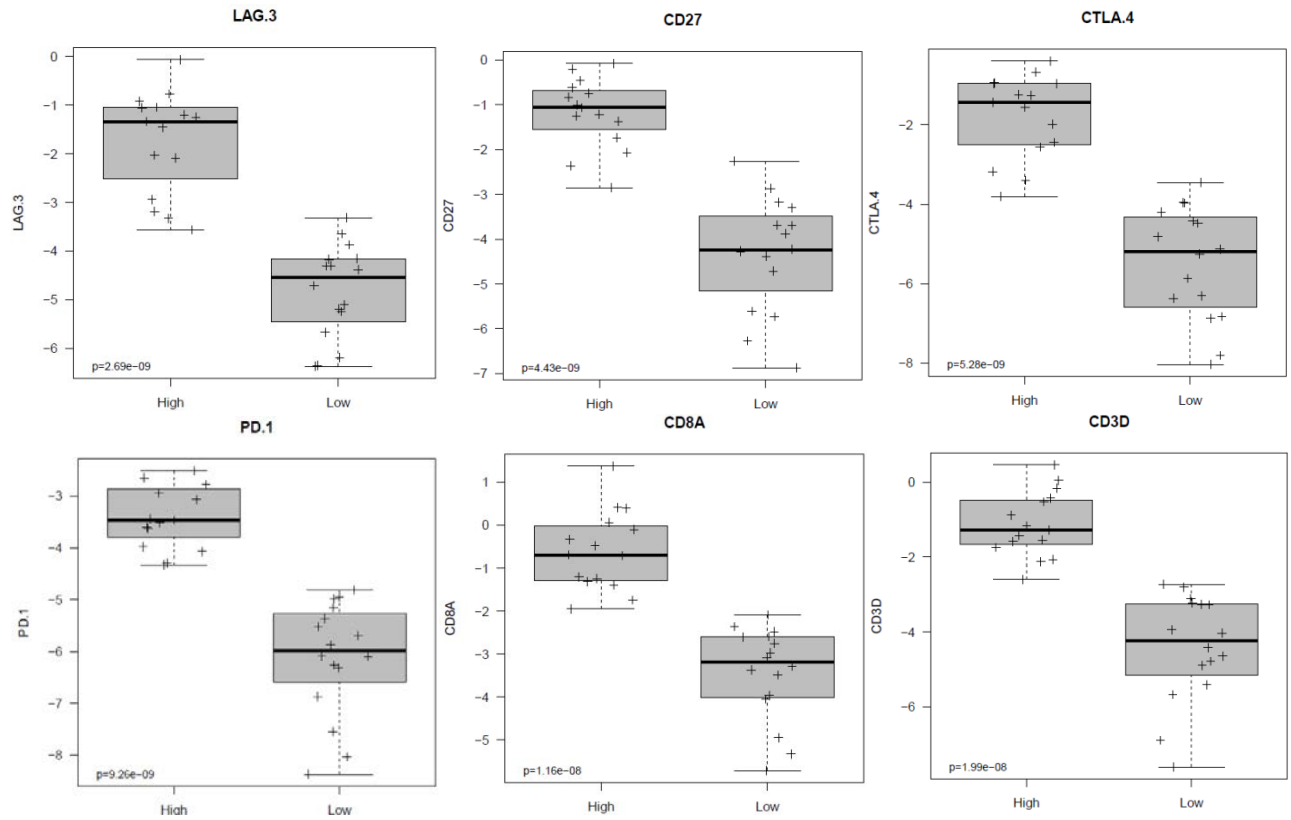
Ir al listado de abreviaturas para el significado de cada gen

TILs: del inglés *Tumor Infiltrating Lymphocytes*

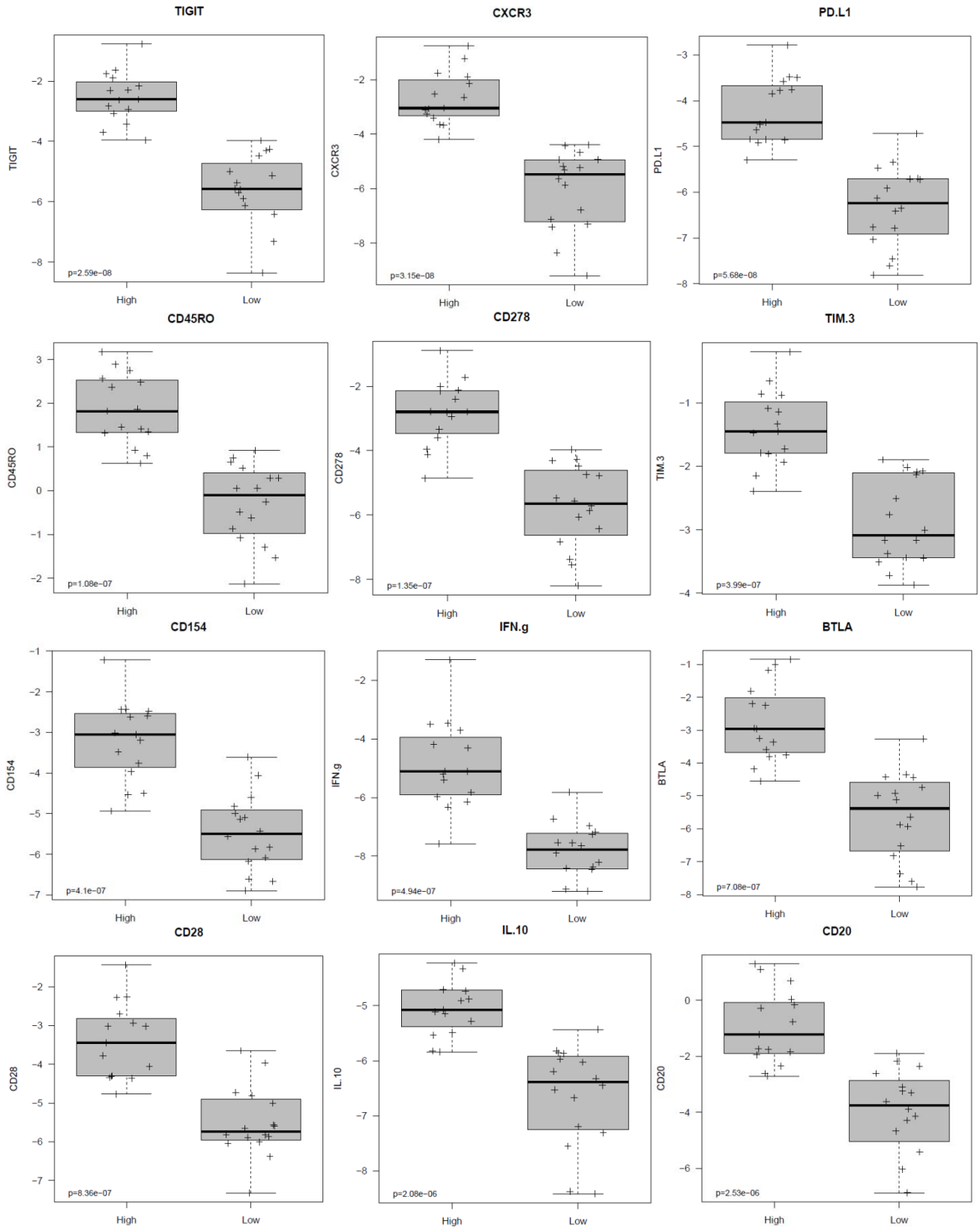
A)

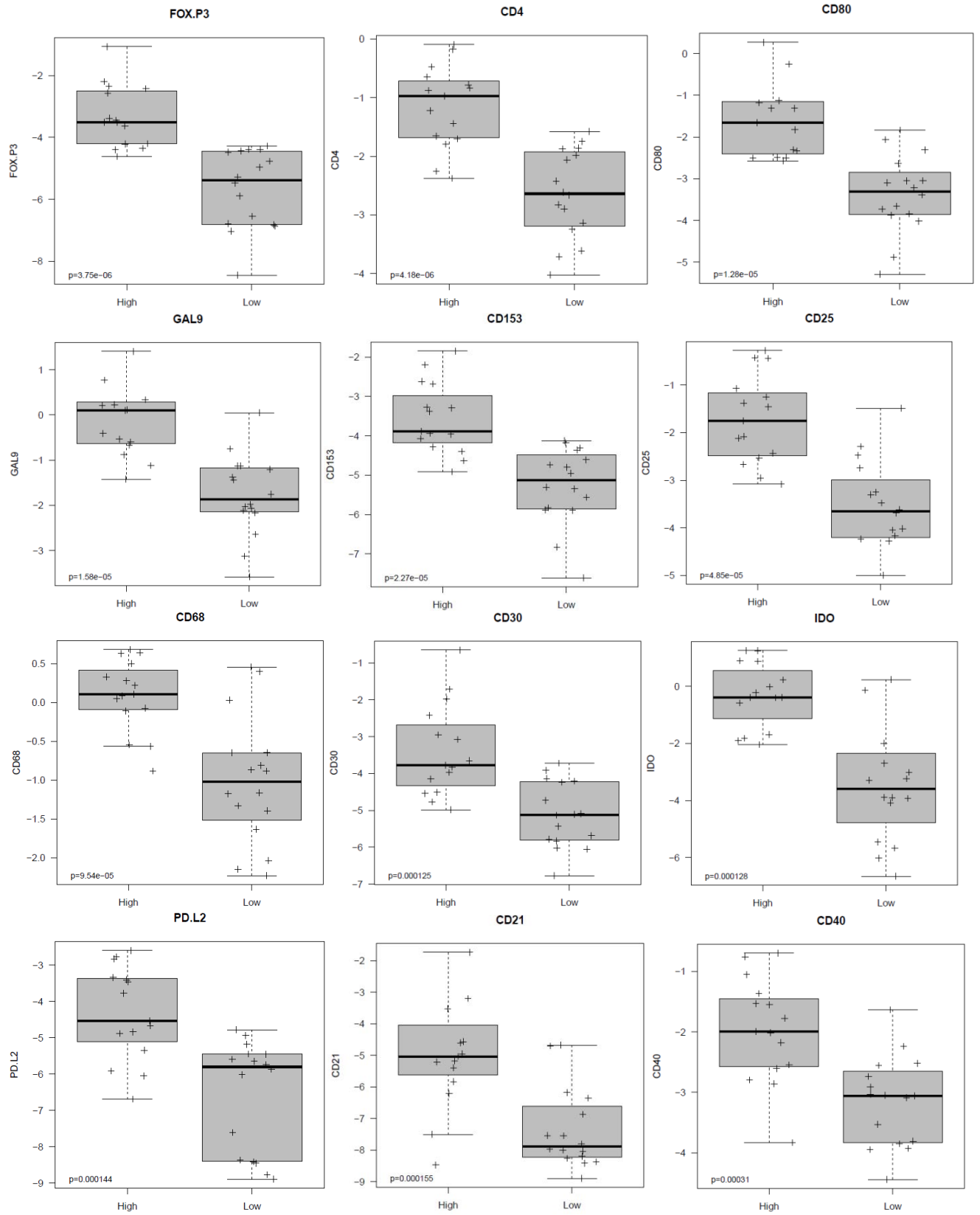


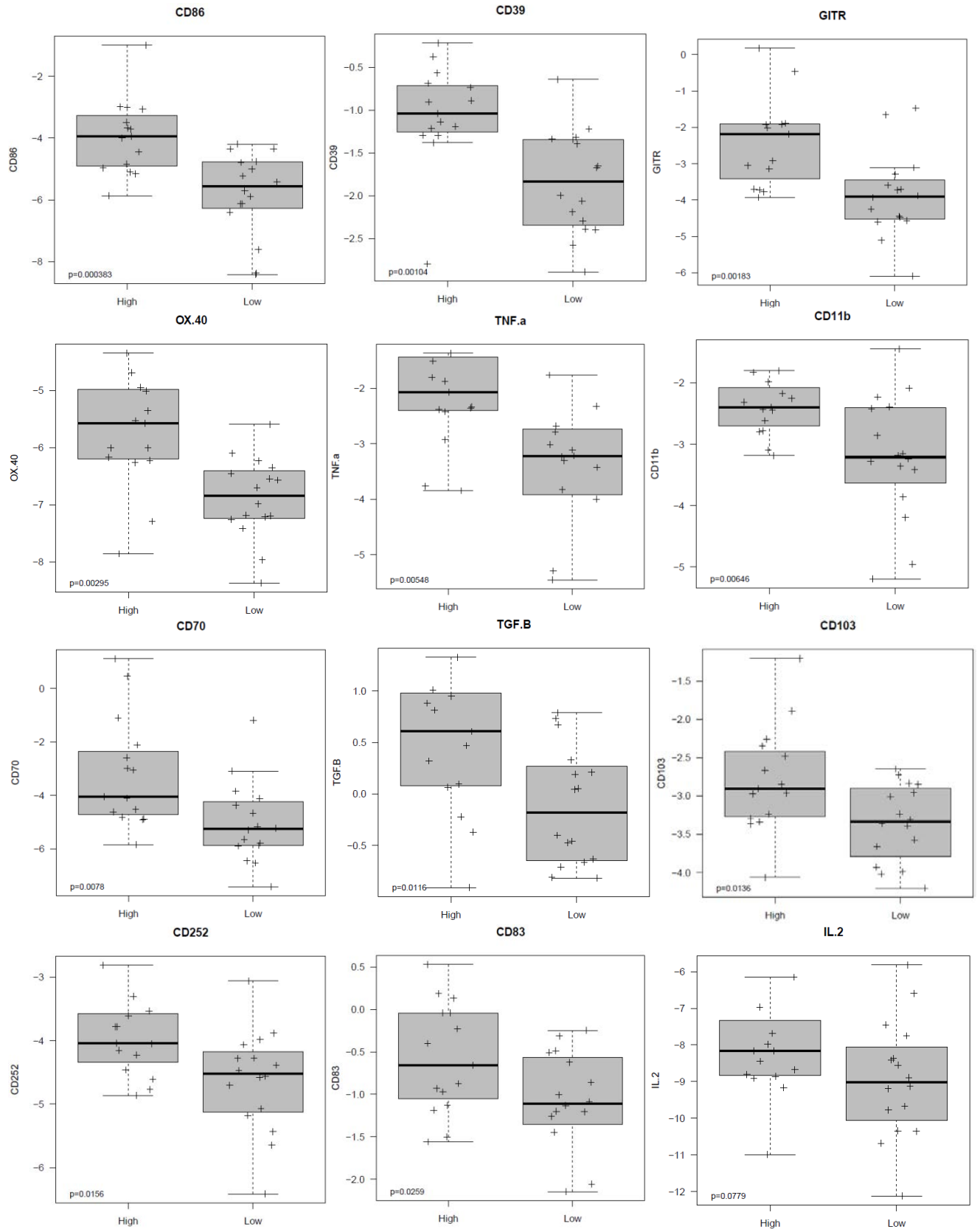
B)

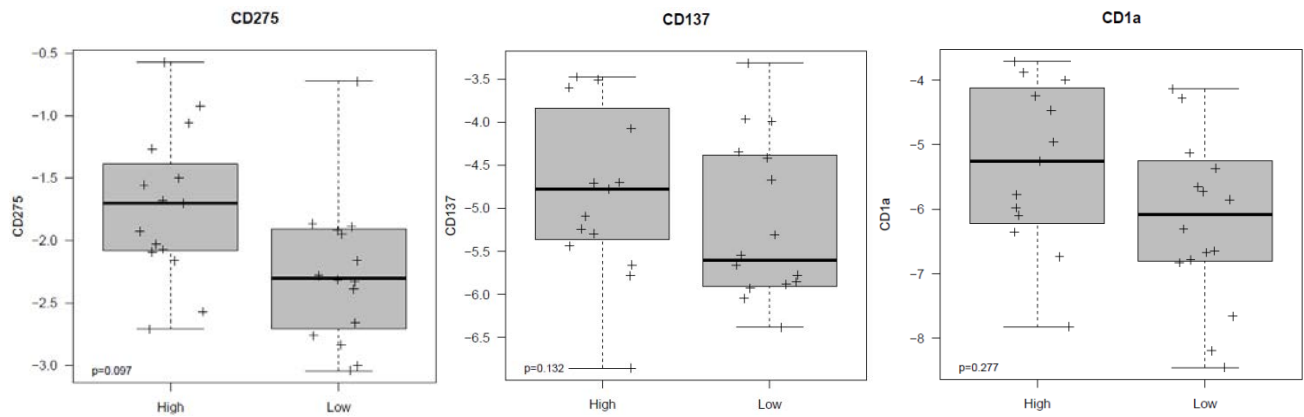










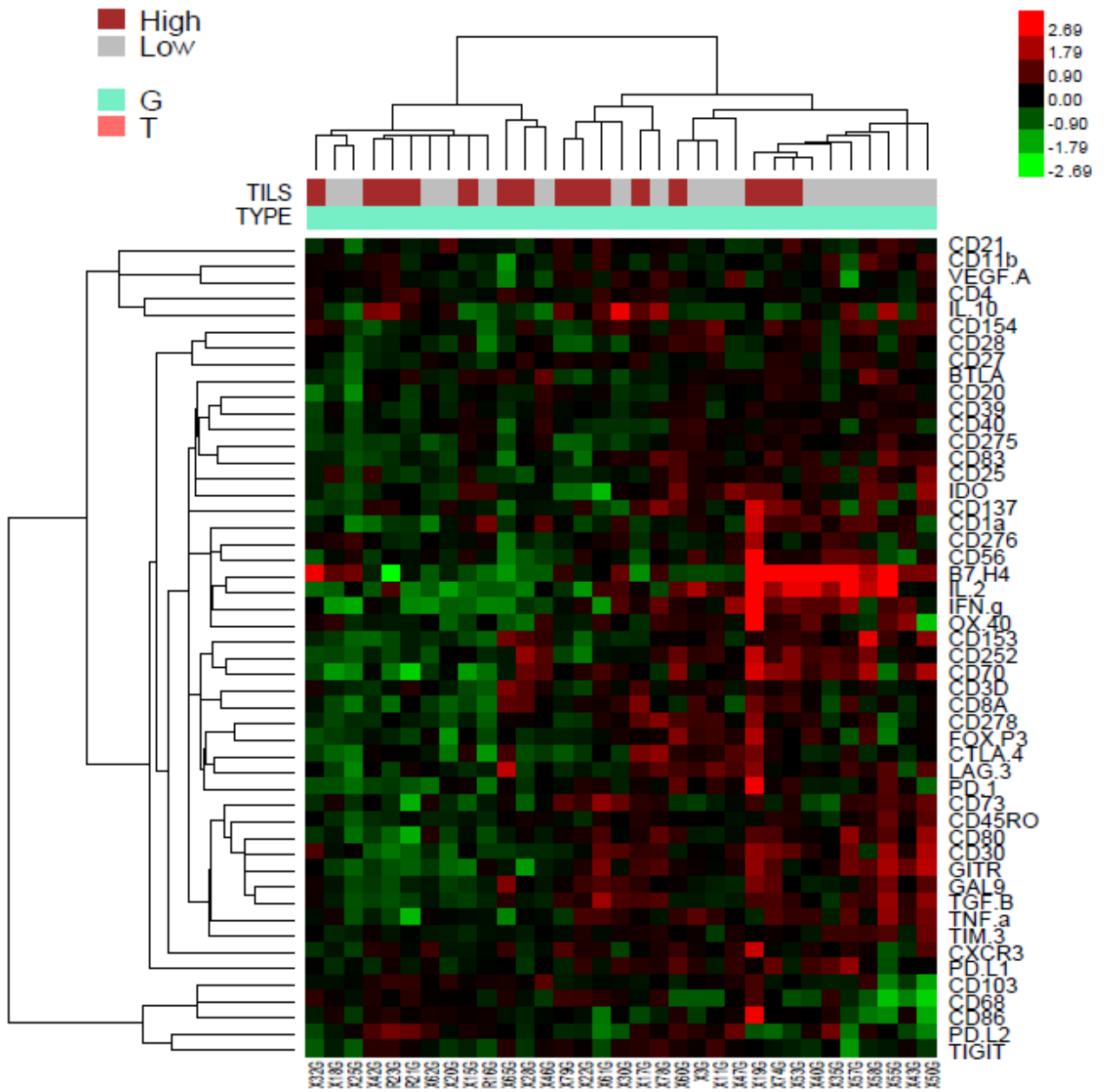


**Figura 43.** Diferencia de expresión génica entre el tumor de las pacientes TILs+ (*high*) y TILs- (*low*) por el análisis ANOVA, ordenados por significación estadística. A) Cinco genes que se expresan más en las pacientes TILs-, de los cuales solo los tres primeros son estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ); B) 45 genes que se expresan más en las pacientes TILs-, de los cuales 41 son estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ).

TILs: del inglés *Tumor Infiltrating Lymphocytes*

### 13.3. Comparación de los ganglios linfáticos entre las pacientes con niveles altos y bajos de *Tumor Infiltrating Lymphocytes*

Se hizo un análisis para ver si había diferencia de expresión de genes entre los ganglios de las pacientes TILs+ y TILs-. En este caso, no se vio ninguna diferencia entre estos dos grupos (Figura 44). Sin embargo, sí se observan dos grupos de pacientes que se clasterizan de manera clara, independientemente de los TILs (Figura 44). Mediante el análisis SAM se observaron solo dos genes, el CD68 (*t score* 1.72) y el CD8A (*t score* 1.28) que estaban más expresados en pacientes TILs+ y que eran estadísticamente significativos. Cuando se comparó gen por gen mediante el análisis ANOVA (menos estricto que el SAM), 19 genes estaban más expresados en las pacientes TILs+ y 31 en las TILs-. Solo 2 de los 19 genes más expresados en las TILs+ salieron estadísticamente significativos genes (el CD68 con  $p=0.0115$ , y el CD4, con  $p=0.0333$ ) (Figura 45A). El análisis del CD8A presentó una tendencia a la significación ( $p=0.0537$ ); y el CD3D, que está relacionado con el CD4 y CD8A, aunque no fue estadísticamente significativo, también presentó una tendencia a la misma ( $p = 0.0729$ ), y además sorprendió ver que su expresión estaba muy acotada en las pacientes TILs- (Figura 45A). Ninguno de los 31 genes que estaban más expresados en las TILs- fueron estadísticamente significativo (Figura 45B).



**Figura 44.** Heatmap de todas las muestras de ganglio, clasificadas por TILs+ (high en marrón) y TILs- (low, en gris). T: tumor; G: ganglio; TILs: del inglés *Tumor Infiltrating Lymphocytes*.

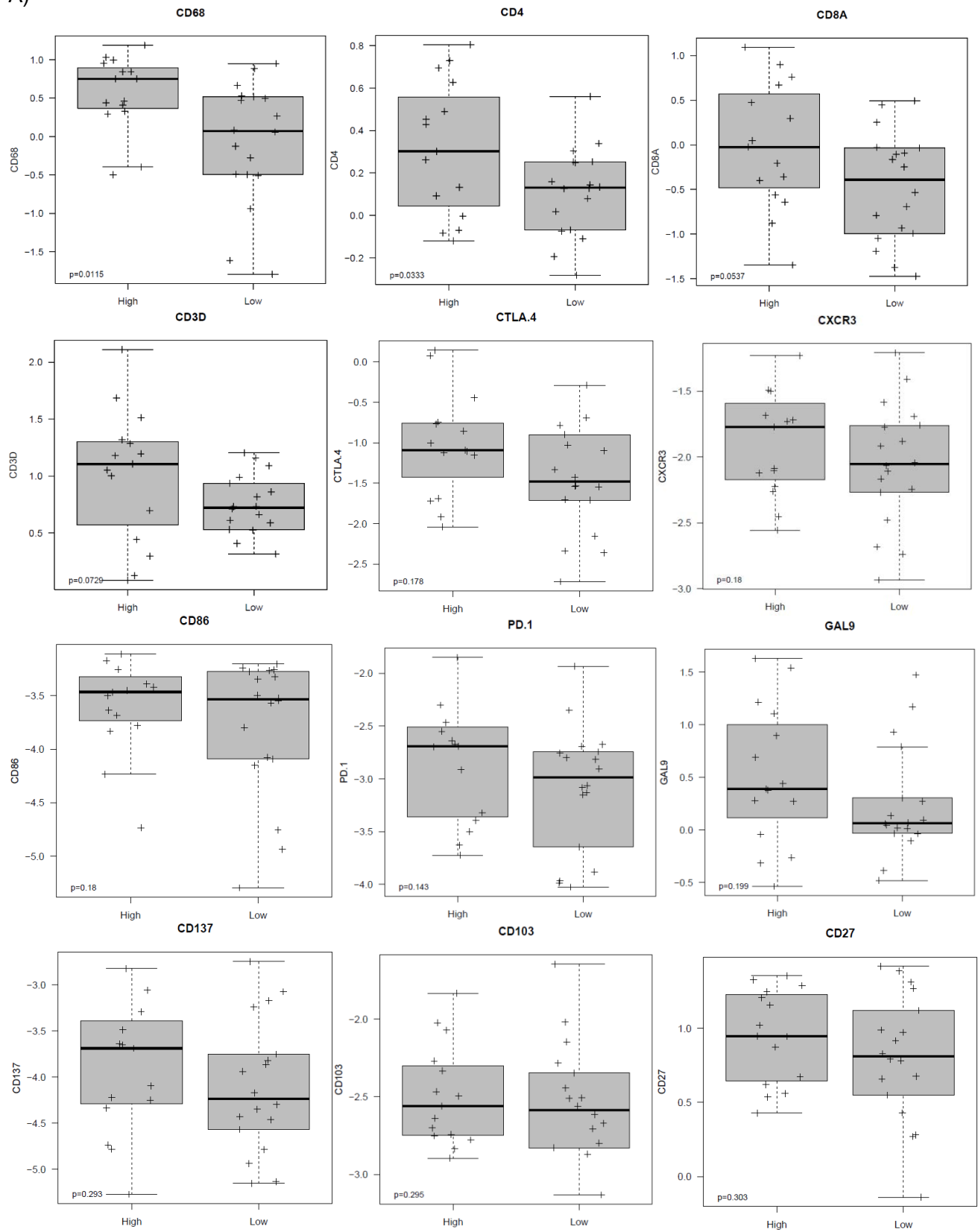
**Tabla 22.** Análisis comparativo del ganglio en pacientes TILs+ vs. TILs-. Genes más y menos regulados en el ganglio de pacientes TILs+ ordenados según el *t score*. Un valor de *q-value* < 5 es estadísticamente significativo.

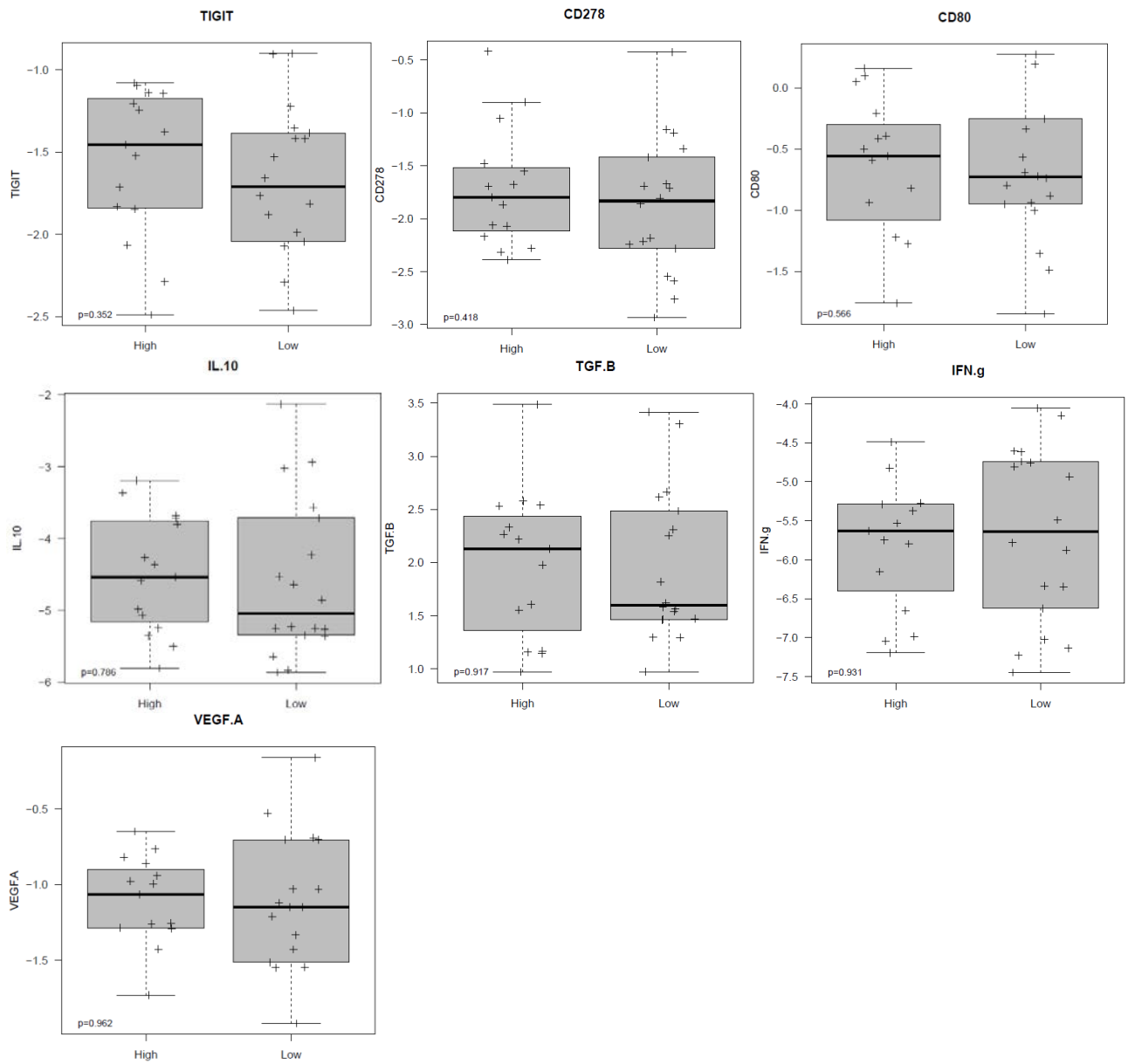
Gen	<i>t score</i> (d)	<i>Fold Change</i>	<i>q-value</i> (%)	Gen	<i>t score</i> (d)	<i>Fold Change</i>	<i>q-value</i> (%)
CD68	1.72	1.55	0.00	GITR	-0.74	0.80	61.71
CD8A	1.28	1.38	0.00	CD83	-0.73	0.85	61.71
CD3D	1.02	1.23	35.56	IDO	-0.70	0.82	61.71
PD.1	0.99	1.30	35.56	CD275	-0.66	0.87	61.71
CD4	0.91	1.15	35.56	CD276	-0.62	0.87	61.71
CTLA.4	0.91	1.27	35.56	CD40	-0.59	0.89	61.71
CD86	0.90	1.27	35.56	CD153	-0.58	0.85	61.71
CXCR3	0.82	1.20	35.56	IL.2	-0.57	0.77	61.71
GAL9	0.80	1.21	35.56	CD11b	-0.54	0.89	61.71
CD137	0.72	1.23	40.00	TIM.3	-0.53	0.91	61.71
CD103	0.61	1.14	61.71	CD39	-0.51	0.92	61.71
TIGIT	0.55	1.13	61.71	CD154	-0.48	0.90	61.71
CD27	0.53	1.10	61.71	CD1a	-0.46	0.88	61.71
CD278	0.51	1.13	61.71	CD80	-0.38	0.90	61.71
FOX.P3	0.43	1.12	62.22	CD30	-0.36	0.90	61.71
CD70	0.22	1.08	62.22	CD73	-0.36	0.91	61.71
IL.10	0.20	1.07	62.22	PD.L1	-0.34	0.93	61.71
CD21	0.07	1.01	62.22	CD56	-0.30	0.91	61.71
TGF.B	0.07	1.02	62.22	B7.H4	-0.29	0.84	61.71
IFN.g	0.07	1.02	62.22	PD.L2	-0.21	0.94	67.03
OX.40	0.05	1.02	62.22	CD28	-0.06	0.99	72.00
VEGF.A	0.03	1.01	62.22	CD252	-0.05	0.99	72.00
CD45RO	0.00	1.00	62.22	BTLA	-0.04	0.99	72.00
TNF.a	-1.15	0.74	61.71	LAG.3	-0.02	1.00	72.00
CD25	-0.95	0.82	61.71	CD20	-0.01	1.00	72.00

Ir al listado de abreviaturas para el significado de cada gen

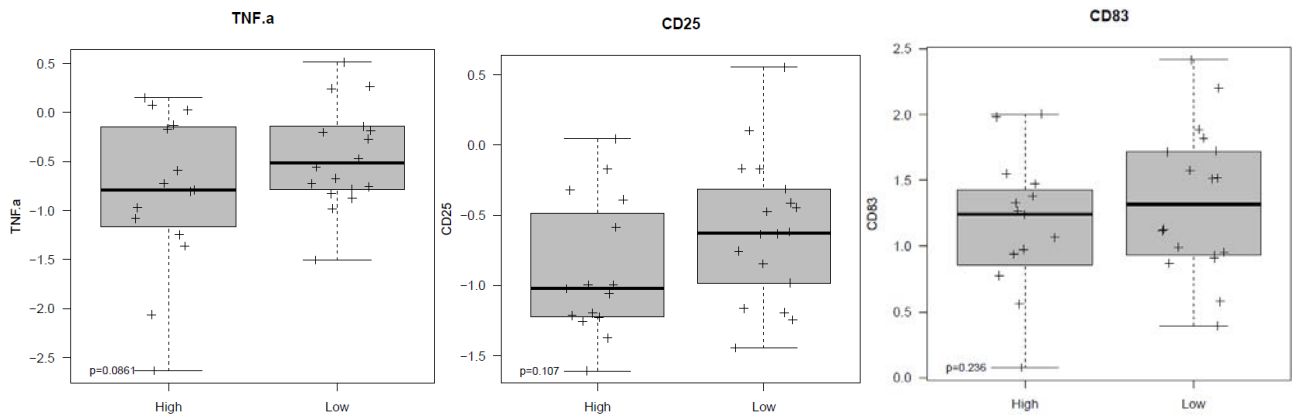
TILs: del inglés *Tumor Infiltrating Lymphocytes*

A)

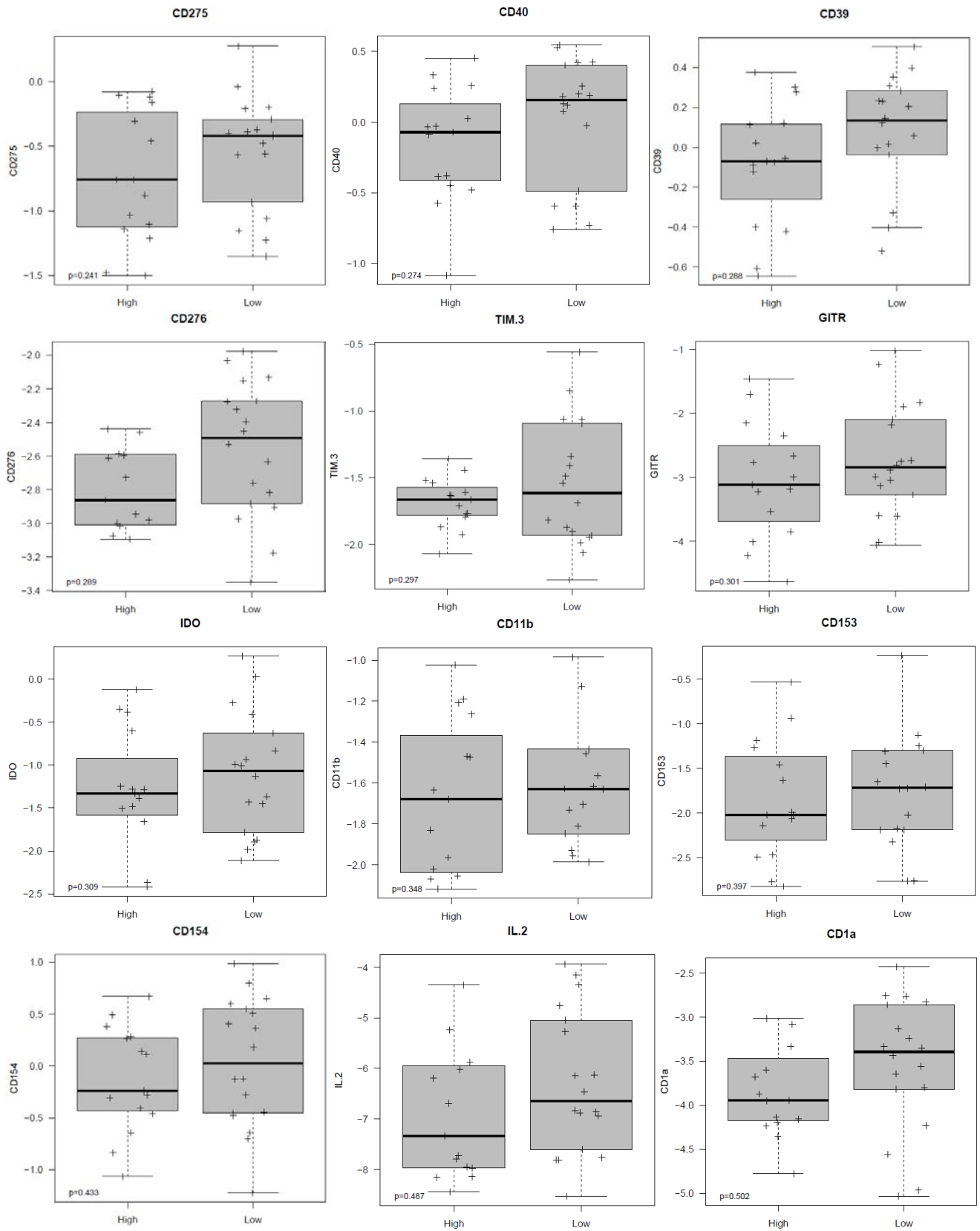


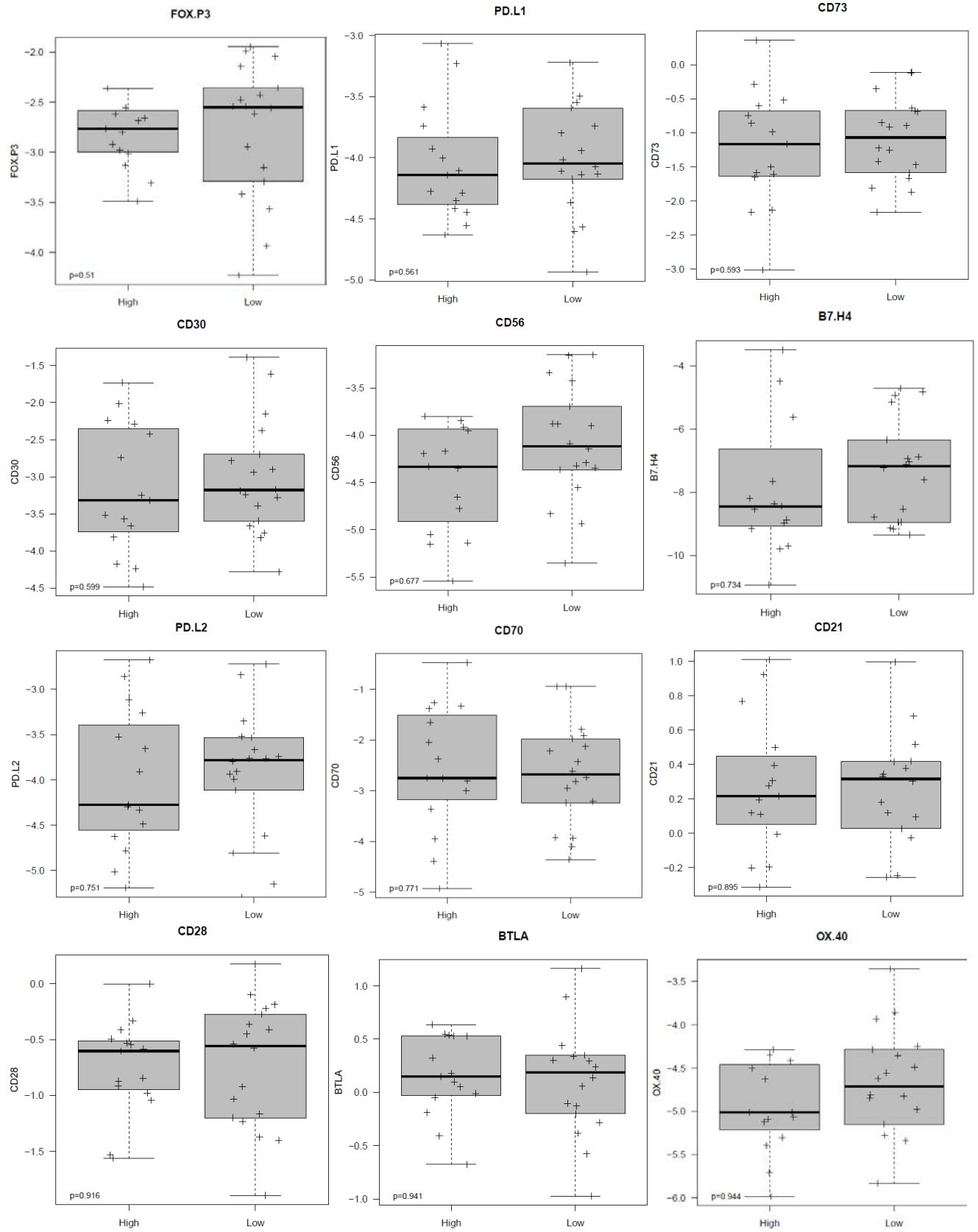


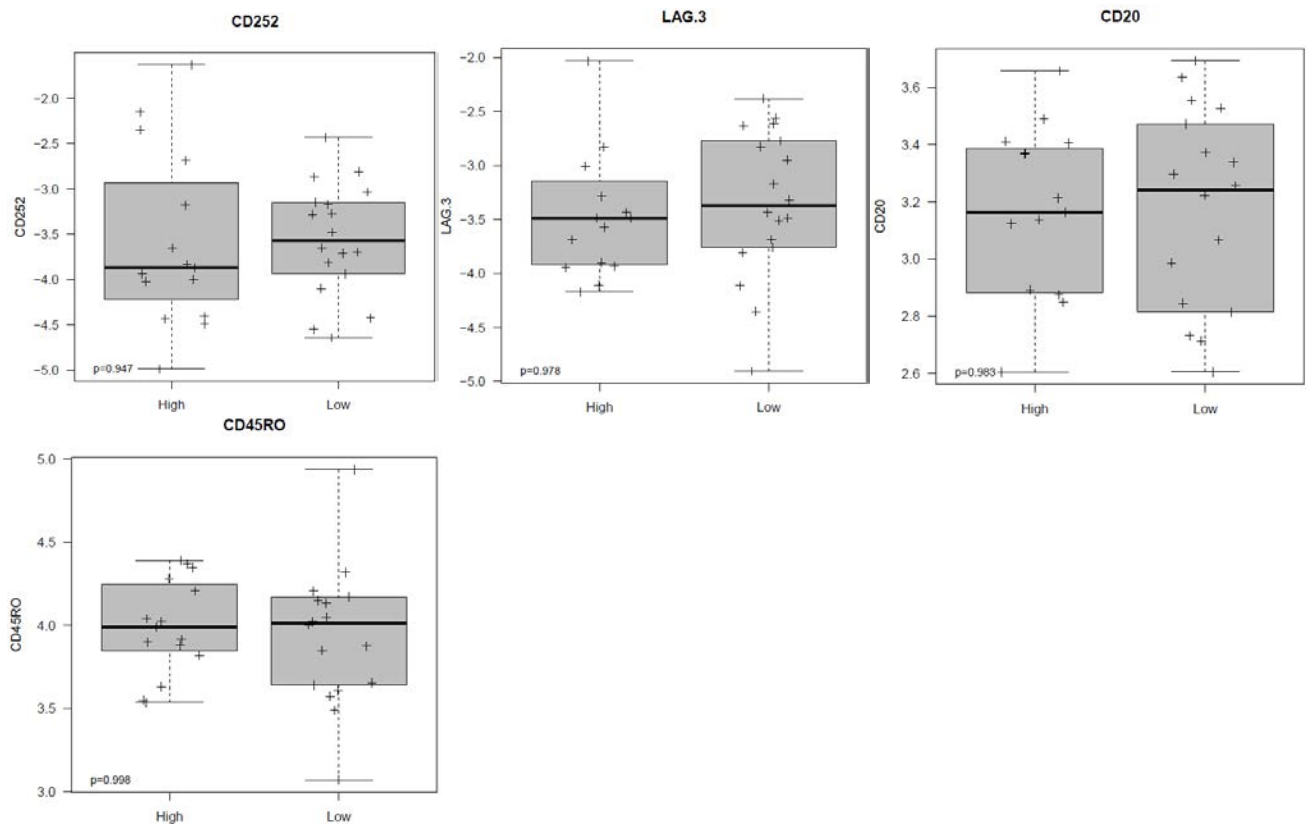
**B)**











**Figura 45.** Diferencia de expresión génica entre el ganglio de las pacientes TILs+ (*high*) y TILs- (*low*) por el análisis ANOVA, ordenados por significación estadística. A) 19 genes más expresados en TILs+, donde solo 2 genes tienen significación estadística (CD68 y CD4). El CD8A ( $p = 0.0537$ ) y el CD3D ( $p = 0.0729$ ) tienen tendencia a la significación; B) 31 genes más expresados en TILs-, donde ninguno es estadísticamente significativo.

TILs: del inglés *Tumor Infiltrating Lymphocytes*.

# DISCUSIÓN

---

## DISCUSIÓN

Los estudios previos sobre los TILs han demostrado cómo su presencia mejora el pronóstico de las pacientes con CMTN en términos de aumento de RCp en la neoadyuvancia, y de mayor SLP y SG después de la quimioterapia adyuvante<sup>44,45,59-63</sup> y neoadyuvante<sup>43,51-56</sup>. Este hecho nos ha hecho preguntarnos por qué hay algunas pacientes que presentan TILs en el tumor al diagnóstico mientras que otras no lo tienen. Una de las posibles causas que podría explicarnos la ausencia de linfocitos en el tumor es que estos se han quedado bloqueados en el ganglio linfático local. Entendiendo estos mecanismos de bloqueo, se podrían aplicar diferentes tratamientos para poder revertirlos e inducir la presencia de estas células en el tumor. Con esta sencilla estrategia terapéutica, podríamos optimizar el sistema inmune para que pueda tener una sinergia con los tratamientos de quimioterapia, y así mejorar el pronóstico de estas pacientes.

Gracias al presente trabajo, hemos podido confirmar la hipótesis principal por IHQ de que los linfocitos parecen quedar retenidos en el ganglio linfático en gran medida por el marcador CTLA-4 (mediana 7% [2,0% - 12%] vs. 3% [0,5% - 9%],  $p=0.01$ ). Esta hipótesis ha sido además corroborada por los otros biomarcadores de inhibición (PD-1, PD-L1 y PD-L2), que han salido estadísticamente no significativos en el ganglio ( $p=0.89$ ,  $p=0.29$  y  $p=0.11$ , respectivamente).

Los medicamentos anti-CTLA-4 han tenido resultados positivos en melanoma metastásico, consiguiéndose la aprobación del ipilimumab en 2011<sup>89</sup>, y con posterioridad en otras patologías. Lamentablemente en CM metastásico no ha habido tanto éxito, habiéndose probado en tumores con receptores hormonales avanzados combinado con exesmetano<sup>90</sup> o en CM metastásico en monoterapia<sup>91</sup>, con resultados bastante pobres. Sin embargo, es llamativo observar cómo no hay estudios publicados en la literatura con tremelimumab o ipilimumab en tumores triple negativos que son los que, al menos desde un punto de vista teórico, serían los tumores que más se beneficiarían de las maniobras inmunológicas.

Actualmente hay numerosos estudios que están probando lo aCTLA-4 en neoadyuvancia, solo o en combinación, de los que ya han salido resultados en melanoma<sup>92,93</sup> y cáncer colorrectal<sup>94</sup>. En estos estudios se ha visto que hay una expansión clonal de linfocitos T, especialmente en pacientes que tienen respuesta completa patológica. En el estudio de colon<sup>94</sup> (NICHE, NCT03026140), donde se combinaba ipilimumab con nivolumab neoadyuvante, se vio que todos los dMMR (del inglés *deficient Mismatch Repair*) (7 pacientes) alcanzaban mayores respuestas patológicas (4 de ellos tuvieron RCp), y ninguno de los 8 pacientes pMMR (del inglés *proficient Mismatch Repair*) lo hacían. Esta diferencia en respuesta no se pudo predecir por la infiltración por CD3 ( $p=0.0663$ ) o por firmas de

genes inmunes, aunque sí que se vio diferencias entre la firma de INF- $\gamma$  después del tratamiento. Esta incrementaba significativamente en los tumores dMMR ( $p=0.036$ ) pero no en los pMMR ( $p=0.08$ ), contribuyendo a distinguir mejor entre los que respondían al tratamiento (dMMR) de aquellos que no respondían (pMMR). El TMB era más alto en los pacientes dMMR que en los pMMR (mediana 1795 vs. 103,  $p=0.008$ ).

Sin embargo, los pacientes con dMMR tenían ya mayor número de linfocitos T citotóxicos de base ( $p=0.27$ ) que los pacientes pMMR. Además, estos los linfocitos T aumentaban 4.8 veces más ( $p=0.0009$ ) después de recibir tratamiento en los pacientes dMMR en comparación con el 2.4 aumento que ocurría en los pacientes pMMR ( $p=0.018$ ). Esto nos da motivos para pensar que en CM podría ocurrir lo mismo, donde pacientes con pocas TILs (que se podría hacer el paralelismo con los pacientes pMMR), podrían llegar a tener también expansión clonal de los linfocitos T. Aunque esta expansión no fuera acompañado de respuesta clínica al tratamiento, podría llegar a mejorar el pronóstico de los pacientes.

En CM se ha realizado una investigación piloto, que consistía en dar una dosis única de ipilimumab solo o combinado con crioblación, o crioblación sola, antes de una mastectomía para evaluar la seguridad y la tolerabilidad de la combinación<sup>95</sup>. Se incluyeron 19 pacientes de CM independientemente de su histología. Aunque el estudio tenía poco poder estadístico, se observó que las pacientes que habían recibido el ipilimumab junto con la crioblación tenían más TILs y mayor ratio de proliferación (Ki67+) de CD4+ ( $p=0.05$ ) y CD8+ ( $p=0.005$ ) que de linfocitos T reguladores<sup>95</sup>. También se observó un aumento de la expresión de ICOS en los linfocitos T CD4+ y CD8+ en sangre después de la administración de ipilimumab e ipilimumab+criablación ( $p=0.05$  en CD4+ y  $p=0.005$  e CD8+ comparado con crioblación sola), y duraron hasta un mes después de la administración, especialmente en los pacientes que lo recibieron ipi+crioblación<sup>95</sup>. Esto fue acompañado de un aumento de IL-2, IL-12 e IFN- $\gamma$  en la sangre mayor también en el brazo de ipi+crioblación que en los otros dos brazos<sup>95</sup>.

El estudio ULTIMATE (NCT02997995), actualmente abierto, está valorando diferentes estrategias para inducir infiltración de linfocitos CD8 en el tumor en pacientes RE+/HER2 con tremelimumab (parte 1) y posteriormente activarlos con durvalumab (parte 2), y ambas combinadas con exesmetano. El estudio consiste en dar una única dosis de tremelimumab y hacer una biopsia a la paciente 3 semanas después de la infusión. Si la paciente ha alcanzado una infiltración del 10% de linfocitos T CD8, pasaría a la parte 2, donde recibiría durvalumab durante 6 meses hasta la operación. El objetivo primario sería la RCp y se probarían también otras tres inmunoterapias además del tremelimumab para inducir la infiltración de linfocitos.

Nosotros proponemos que, a partir de nuestros resultados, sería interesante administrar una dosis de aCTLA-4 en pacientes de CMTN que tuvieran pocos TILs al diagnóstico. Aunque en nuestro proyecto no hemos incluido pacientes con TILs intermedias ( $\geq 5\%$  y  $< 50\%$ ) para poder optimizar los resultados, si estos pacientes sería candidatos o no a esta maniobra terapéutica es un aspecto que desconocemos. El objetivo principal sería conseguir que las pacientes con  $< 5\%$  tuvieran un aumento de TILs del 10% o más, ya que se ha visto que por cada 10% de incremento de TILs el riesgo de recurrencia disminuye un 14% y el de muerte un 18%<sup>45</sup>.

Cabe destacar que la tinción de PD-L2 también era más alta en pacientes TILs y tenía una tendencia a la significación ( $p = 0.11$ ). Como hemos comentado previamente, se cree que el PD-L2 también controla la activación de los linfocitos T en los órganos linfoides (lugar de inducción), y por lo tanto podría ser otro marcador de inhibición primario de los linfocitos. Se vio que la diferencia la daba sobre todo porque había mayor tinción poco definida en la zona paracortical donde se encuentran los linfocitos T CD8, que podrían corresponder a la tinción de las digitaciones que las células dendríticas forman para aumentar su superficie para la presentación de antígenos. Haciendo un estudio con un mayor número de muestras, con una tinción para poder identificar los tipos celulares (en especial células dendríticas y linfocitos T CD8) y aumentando la intensidad de la tinción del PD-L2, se podría entender mejor la función de este biomarcador en la inhibición primaria de la respuesta inmune. Actualmente solo se conoce un tratamiento dirigido contra el PD-L2 (rHIgM12B7) y se está probando únicamente en melanoma metastásico<sup>80</sup>, por lo que no se conoce si su efecto es diferente a los tratamientos anti-PD-1. Como hemos señalado en la introducción, el PD-L2 se une a otro biomarcador aún desconocido además del PD-1.

Se vio que también el OX-40 salía estadísticamente significativo en el ganglio, habiendo más expresión en las pacientes TILs- aunque su rango era muy amplio (5% - 100%). Esto podría apoyar la hipótesis principal de que hay muchos linfocitos activados que se han quedado retenidos en el ganglio en las pacientes con menos TILs. En 2011 se completó un ensayo clínico (NCT00900302)<sup>80</sup> donde se estudió el OX-40 y otros biomarcadores relacionados por IHQ y por expresión génica en ganglios linfáticos centinela, no centinela y tumor primario de diferentes tumores, aunque no se ha podido encontrar ninguna publicación sobre este ensayo.

Hubiera sido interesante haber tenido una muestra de ganglios control para ver la expresión de estos marcadores en personas sanas, para compararlo con los dos grupos y ver quien tiene una expresión más alta, más baja o igual que en una persona sin cáncer.

El diseño del estudio nos ha permitido considerar también otros objetivos secundarios para poder entender mejor las diferencias entre estas pacientes y generar nuevas hipótesis. El estudio del ganglio linfático se amplió con un estudio de la regulación del sistema inmune en el tumor. Solo se

pudo comparar la tinción en las células tumorales de PD-L1 y OX-40, ya que la tinción del PD-L2 en las células tumorales era mínima y en muy pocas muestras, y el PD-1 y CTLA-4 solo teñía las TILs. La tinción de PD-L1 en las células tumorales ha salido estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ), habiendo más tinción en las pacientes TILs+. Este resultado es también importante ya que se sabe que es un marcador de inhibición secundario que aparece en el lugar de acción de los linfocitos, por lo que las células tumorales lo podrían estar utilizando para desactivarlos. El PD-L1 es un biomarcador que se está valorando en numerosos ensayos clínicos como predictor de respuesta tanto para tratamientos anti-PD-L1 como para anti-PD-1, y ya ha sido aprobado como CDx en varios tipos de cáncer. Cabe destacar que siempre había tinción de PD-L1 en el infiltrado linfocitario de las pacientes TILs+, siendo su mediana 15%, rango [3% - 60%].

En el grupo de las pacientes TILs+, cuando se consideró la valoración de PD-L1 en el tumor y en el infiltrado linfocitario como variable dicotómica ( $\geq 1\%$  y  $\geq 10\%$  respectivamente), se vio que no había ninguna paciente cuyas células tumorales fueran PD-L1+ y no lo fueran las TILs, y sí que había pacientes que tenían tinción PD-L1+ en las TILs y no en las células tumorales ( $p < 0.01$ ). Cuando se comparó, de manera dicotómica también, la tinción de las células tumorales con el tamaño del tumor ( $\leq 20$  mm y  $> 20$  mm), no se vio ninguna correlación estadísticamente significativa ( $p = 0.37$ ). Aunque la n es pequeña (15 pacientes), nos podría estar indicando que la inhibición periférica empieza primero con los linfocitos T (reguladores y/o citotóxicos), como consecuencia de una inflamación crónica, y después aparece en las células tumorales, como mecanismo de inmunidad adaptativa. La expresión de PD-L1 en las células tumorales no guarda relación con el tamaño del tumor.

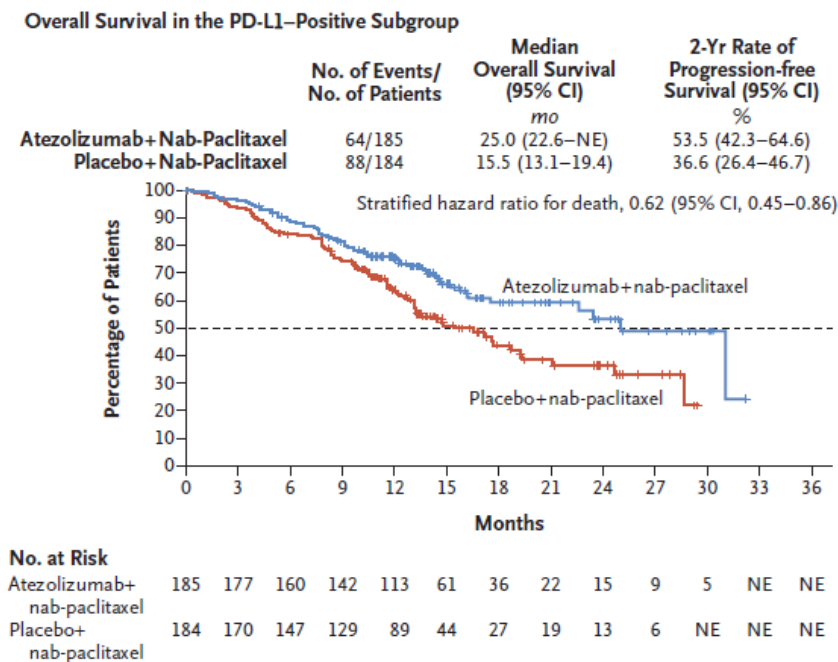
Actualmente se están realizando ensayos que combinan aPD-1 y aPD-L1 con QT neoadyuvante basada en antraciclinas y taxanos con o sin carboplatino. En el contexto neoadyuvante, se reportaron los primeros datos del ensayo KEYNOTE-173 en 2017, donde las tasas de RCp (ypT0ypN0) en el tumor primario y axila fueron del 50% en la cohorte sin carboplatino (cohorte A, 10 pacientes), y 80% en la cohorte con carboplatino cada 3 semanas (cohorte B, 10 pacientes)<sup>96</sup>. En 2018 se reportaron los resultados globales de RCp en las 6 cohortes, y fue el 60% (60 pacientes en total). Se reportó también la SLP a los 12 meses, que fue del 100% en cohortes B, C, E y F; 90% (90% IC, 58-98) en cohorte D; y 80% (90% IC, 49-93) en cohorte A (era la única que no llevaba carboplatino). El 100% de las pacientes que tuvieron RCp no habían recaído a los 12 meses, en comparación con el 88% (90% IC, 71-95) de las pacientes que no alcanzaron la RCp (tres pacientes que no habían recibido carboplatino)<sup>97</sup>.

Resultados similares a la cohorte sin carboplatino se reportaron para la combinación de durvalumab con nab-paclitaxel y dosis densas de doxorrubicina y ciclofosfamida (tasa de RCp del 56% en 16 pacientes, 95% IC 32-78)<sup>98</sup>. Los nuevos estudios están valorando también añadir pembrolizumab



adyuvante después de combinarlo con la quimioterapia neoadyuvante (KEYNOTE-522, NCT03036488) y añadir carboplatino (semanal o cada tres semanas) al paclitaxel según los resultados del KEYNOTE-173<sup>99</sup>. No se ha reportado nada sobre TILs o PD-L1 como biomarcadores predictivos y pronósticos en estos ensayos, pero son objetivos secundarios en ambos estudios. Se espera que guarden relación con una mayor RCp para que se pueda seleccionar mejor la población que se pueda beneficiar de añadir la inmunoterapia al régimen neoadyuvante.

Donde sí se han reportado resultados del PD-L1 como biomarcador de inmunoterapia en CM ha sido en el ensayo clínico IMpassion130<sup>76</sup>, que llevó a la aprobación en Estados Unidos de la combinación de atezolizumab y nab-paclitaxel en marzo de 2019 para primera línea de CMTN metastásico en pacientes que fueran PD-L1+. Esta combinación aumentaba la mediana de SLP en 1.7 meses en comparación con las pacientes que solo recibieron nab-paclitaxel (7.2 vs. 5.5 meses, HR 0.80 [0.69 – 0.92], p = 0.002) para la población general. En las pacientes PD-L1+, se vio que la diferencia de la SLP era mayor (2.5 meses) cuando se añadía atezolizumab (7.5 vs. 5.0 meses, HR = 0.62 [0.49 – 0.78], p < 0.001). La mediana de SG también era numéricamente mayor en el grupo que recibió atezolizumab, aunque no llegó a ser estadísticamente significativo (21.3 vs. 17.6 meses, HR 0.84 [0.69 – 1.02], p = 0.08) en el análisis interino. Cuando se hizo el análisis en el grupo de pacientes PD-L1+, la diferencia era aún mayor (25.0 vs. 15.5 meses, HR 0.62 [0.45 – 0.86]), aunque al no haber sido estadísticamente significativo el análisis de toda la población estos resultados son tan solo descriptivos (Figura 46)<sup>76</sup>.



**Figura 46.** Supervivencia global en el grupo de pacientes PD-L1+ del estudio IMpassion130. Nótese que no se muestra la p de este análisis ya que la p del análisis de todas las pacientes fue de 0.08.

Fuente: imagen tomada de Schmid *et al.*<sup>76</sup>

La recomendación del test CDx de PD-L1 (clon sp142) para administrar atezolizumab+nab-paclitaxel en CMTN es medir la tinción en el infiltrado inflamatorio (TILs, macrófagos, células plasmáticas)<sup>76</sup> y que sea  $\geq 1\%$ . Sin embargo, el test complementario de este mismo anticuerpo para el cáncer de pulmón al principio recomendaba medirlo en las células tumorales y en el infiltrado inflamatorio y seguir un algoritmo, y actualmente se considera positivo si es  $\geq 1\%$  en el infiltrado inflamatorio o  $\geq 50\%$  en las células tumorales<sup>100</sup>. En nuestro estudio no podríamos haber evaluado solo el infiltrado inflamatorio porque la diferencia entre los dos grupos la daba precisamente la presencia o no de los TILs, y en las pacientes sin TILs había muy poca tinción de macrófagos ya que también había muy pocos. Cabe señalar que en el estudio IMpassion130 se usaron muestras tanto del tumor primario como del sitio metastásico, por lo que a día de hoy no hacen ninguna recomendación sobre cuál sería mejor, y el test se hace según la disponibilidad del tejido.

La tinción tumoral por OX-40 también era mayor en las pacientes TILs-, aunque la variabilidad era muy grande (5% - 100%). Siendo también estadísticamente significativa, este resultado ha sido por un lado un poco sorprendente porque se esperaba que la tinción fuera solo en los TILs, y también de significado incierto ya que no hay mucha literatura reportada de la expresión de este marcador en células tumorales. Se han empezado a hacer ensayos clínicos en tumores avanzados de terapias dirigidas a OX-40, solas o en combinación con quimioterapia, inmunoterapia o radioterapia<sup>80</sup>. Algunos resultados publicados indican que hay un efecto mayor si se añade agonistas del OX-40 a los aPD-L1, y que además se produce un aumento de los linfocitos T CD8+ específicos de antígenos tumorales y linfocitos T CD4<sup>83</sup>. La mayoría de estos estudios son fases I *basket*, pero hay uno (NCT01862900) específico para cáncer de mama con metástasis hepáticas y pulmonares, que combina 3 dosis en días alternos de aOX-40 con radiación estereotáctica del cuerpo a diferentes dosis, siendo uno de los objetivos secundarios medir los niveles de células CD4+ y CD8+ en la sangre. El estudio está completado pero no han publicado ningún resultado aún.

Otro de los objetivos secundarios era conocer un poco más la función de la respuesta humoral en cáncer de mama, a través de la valoración de los anticuerpos en los CG. Se vio que en los CG, la tinción de PD-L1 y PD-L2 era mayor en las pacientes con TILs+, al contrario que ocurría en el resto del ganglio linfático. Sin embargo, solo la expresión de PD-L2 ha sido estadísticamente significativa ( $p=0.03$ ). No se conoce mucho la función de estos ligandos en el CG y mucho menos en el contexto del cáncer. Algunos estudios preclínicos en linfomas han observado que la presencia de estos dos ligandos inhiben la cantidad y calidad de las células T foliculares, y afecta a la formación del CG<sup>101</sup>. Al contrario que el PD-L2, la tinción de OX-40 en el centro germinal es más alta en las pacientes TILs-, y ha salido estadísticamente significativo ( $p=0.01$ ). Como ocurre con los otros marcadores, tampoco se han hecho muchos estudios de la función del OX-40 en el CG. Se cree que funciona

como coestimulador de la activación de los linfocitos B por las células T foliculares, según un estudio preclínico<sup>102</sup>.

El análisis cualitativo y cuantitativo de los centros germinales de los ganglios se observó mayor cantidad de ellos y más grandes en las pacientes TILs+ que en las TILs- (80% vs. 35%). En las muestras de tumor se observó también que las pacientes con más TILs tienen más presencia de TLS (47% vs. 25%) y además más numerosos. Esto se había visto ya en otros estudios de cáncer de mama, como el de Buisseret *et al.*<sup>103</sup>. Este hallazgo podría indicar que hay más presentación de antígeno en las pacientes TILs+, y que no solo provoca una respuesta específica celular (que lo demuestra la presencia de TILs en el tumor), sino también una respuesta humoral en el ganglio (número de CG) e *in situ* (presencia y número de TLS).

Para entender mejor la respuesta humoral *in situ* y correlacionarlo con lo que ocurre en el ganglio linfático local, sería mejor haber hecho cuatro grupos de pacientes, con las mismas características que las pacientes de nuestro estudio pero que fueran: un grupo con TILs y con TLS; otro con TILs pero sin TLS, otro sin TILs pero con TLS, y el último sin TILs y sin TLS. Se necesitarían su tumor primario y su ganglio linfático centinela. Se tendría que hacer un estudio de mutaciones en el tumor primario, y un estudio de diferentes biomarcadores inmunes que incluyan el PD-L1 y el PD-L2 así como diferentes marcadores de linfocitos B, linfocitos Th y células dendríticas foliculares para ver las diferencias entre los cuatro grupos.

También se quiso comparar la misma área teñida con los diferentes anticuerpos y con CD8. Las comparaciones visuales del área paracortical y CG entre las pacientes confirmaban los resultados numéricos. Se observaron resultados interesantes en el tumor de pacientes TILs+, donde algunas TILs CD8+ estromales adyacentes al tumor se teñían de PD-L1 y OX-40, a diferencia de las TILs CD8+ intratumorales, que algunas se teñían de PD-L1 pero casi ninguna de OX-40.

En la prueba de NanoString se vio que los tumores y los ganglios formaban dos clusters separados claramente. El B7.H4, CD276 (B7.H3) y VEGF.A se expresa más en los tumores, especialmente el B7.H4, y el resto de genes más en el ganglio, siendo CD21 y CD20 los de mayor expresión, por el análisis SAM. Que el gen VEGF.A esté más expresado en tumor que en el ganglio es un resultado esperado, ya que es un marcador de angiogénesis que se expresa en las células tumorales para favorecer el crecimiento de vasos sanguíneos alrededor del tumor. La expresión más alta de los otros dos (B7.H4 y CD276) nos puede indicar que hay otros marcadores de inhibición secundaria de linfocitos expresados en las células tumorales que podrían tener un rol en CMTN además del PD-1/PD-L1. Por otro lado, es de esperar que el CD21 y CD20 estén más expresados en el ganglio porque son marcadores de linfocitos B y, como hemos visto en los resultados de la IHQ, su presencia en el tumor es sobre todo en los TLS y no todas las muestras los tienen.

En la comparación de tumor TILs+ vs. TILs- por NanoString también se vio que clusterizan claramente. El B7.H4, CD276 (B7.H3), VEGF.A, CD73 y CD56 están más expresados en tumores TILs- (todos  $p < 0.05$  según el análisis SAM, según el análisis ANOVA el CD73 y el CD56 no son estadísticamente significativos). El resto de genes está más expresado en TILs+ ( $p < 0.05$ ), siendo el CTLA-4 el que más está expresado. Estos resultados podrían indicar que los marcadores B7.H4 y B7.H3 están expresados en las células tumorales y no en las TILs, pero resulta difícil de explicar cómo pueden inhibir los linfocitos si no hay presencia de ellos en los tumores TILs-, y la inhibición se espera que sea por contacto. Además, tampoco se conoce cuál es el receptor de los linfocitos que se une a ellos y qué procesos provoca en el linfocito, es aún más complicado establecer una hipótesis en esta dirección. Una explicación más lógica sea que provoque activación de cascadas internas de la célula tumoral para hacerla más agresiva, evitando su apoptosis y favoreciendo la aparición de metástasis. Un estudio por IHQ nos ayudaría a comprobar si están expresados en la superficie celular, pero después sería necesario comprender cuál es su ligando y qué otras vías moleculares podrían estar asociadas a esta expresión. En un estudio en cáncer de mama se vio por IHQ que la expresión de B7.H4 y PD-L1 era prácticamente excluyente, habiendo muy pocas muestras doblemente positivas<sup>104</sup>. También se observó que la expresión de B7.H4 no guardaba relación con el subtipo histológico, mientras que la de PD-L1 es mucho más común en CMTN que en los otros subtipos<sup>104</sup>. Un análisis más exhaustivo de este marcador podría abrir puertas para la inmunoterapia en cáncer de mama RH+, donde se ha considerado que el sistema inmune jugaba un papel más secundario y que era más importante la expresión de los RH para el crecimiento del tumor.

Actualmente hay ensayos en marcha para ambos biomarcadores. Para el B7.H3, hay varios ensayos, siendo tres los que se podrían considerar más relevantes<sup>80</sup>: el NCT02475213, un fase I *basket* que combina enoblituzumab (aB7.H3) con pembrolizumab; el NCT03406949, un fase I que combina el conjugado MGD009 (B7.H3 + la proteína CD3 DART) y con un anti-PD-1 en tumores B7.H3+ (incluyendo CM); y el NCT02381314, un fase I que combina enoblituzumab con ipilimumab en varios tipos de cáncer que expresen B7.H3, incluyendo el CMTN. Los tres estudios son de MacroGenics y son con escalada de dosis y con expansión de cohortes, por lo que se probarán en un número considerable de pacientes. Para el B7.H4 solo hay actualmente un ensayo en marcha, el NCT03514121, que prueba FPA150, un anti-B7H4 solo o en combinación con pembrolizumab. Es un fase 1a/1b que incluye varios tipos de tumores (entre ellos el CM) y se espera reclutar 278 pacientes.

Ambos biomarcadores se están evaluando junto con los aPD-1/aPD-L1 y aCTLA-4, que son las dos inmunoterapias más importantes en tumores sólidos. En muchos estudios de estos fármacos se ha visto que la respuesta es variable y solo alrededor de un 20% de los pacientes consiguen que esas respuestas se mantengan a lo largo del tiempo<sup>105</sup>. La combinación podría aumentar el porcentaje de pacientes que respondan a la inmunoterapia y conseguir una respuesta más durable en el tiempo.

En dos de los tres ensayos del B7.H3 mencionados están seleccionado de entrada a los pacientes por la expresión de B7.H3, y en ninguno de ellos lo están probando sin combinar con otros tratamientos. Sin embargo, el aB7.H4 sí que se está probando en monoterapia e incluirán pacientes que no expresen B7.H4, aunque la expansión de cohortes se prevé que sean en tumores B7.H4+ pero todo dependerá del análisis de eficacia preliminar.

En la comparación entre los ganglios linfáticos por NanoString de las pacientes TILs+ vs. TILs- no se observa ninguna clusterización por estos grupos, aunque las pacientes se dividen en dos grupos independientemente de los niveles de TILs. Por el análisis SAM solo hubo significación estadística en dos genes: el CD68 (marcador de macrófagos) y el CD8 (células T citotóxicas) estaban más expresados en los ganglios linfáticos de las pacientes TILs+. Por el análisis ANOVA, menos riguroso, salían estadísticamente significativos el CD68 ( $p = 0.0115$ ) y CD4 ( $p = 0.0333$ ); el CD8A no llegaba a salir significativo ( $p = 0.0537$ ). Estos resultados podrían indicar que las pacientes TILs+ tienen más presentación de antígenos a través de los macrófagos (CD68+), y por tanto ha habido una expansión clonal de linfocitos T CD8+ y CD4+ en el ganglio que explicaría que el tumor este lleno de TILs. Hubiera sido muy interesante haber tenido una muestra de ganglios de personas sanas para comparar los niveles de estos marcadores cuando el sistema inmune está en estado basal, para tener una idea si es que aumenta respecto al normal en pacientes TILs+ o es que baja en pacientes TILs-. Este hallazgo nos hace pensar que las pacientes TILs+ puedan tener mutaciones que produzcan neoantígenos más inmunogénicos y, por tanto, ser capaces de provocar una respuesta inmune mucho mayor. Haciendo secuenciación completo del exoma podríamos comparar las mutaciones en cada grupo, y a través de pipelines informáticos como el pVAC-Seq<sup>106</sup> o MuPeXI<sup>107</sup> se podría identificar mutaciones que pudieran ser inmunogénicas y compararlas entre los dos grupos.

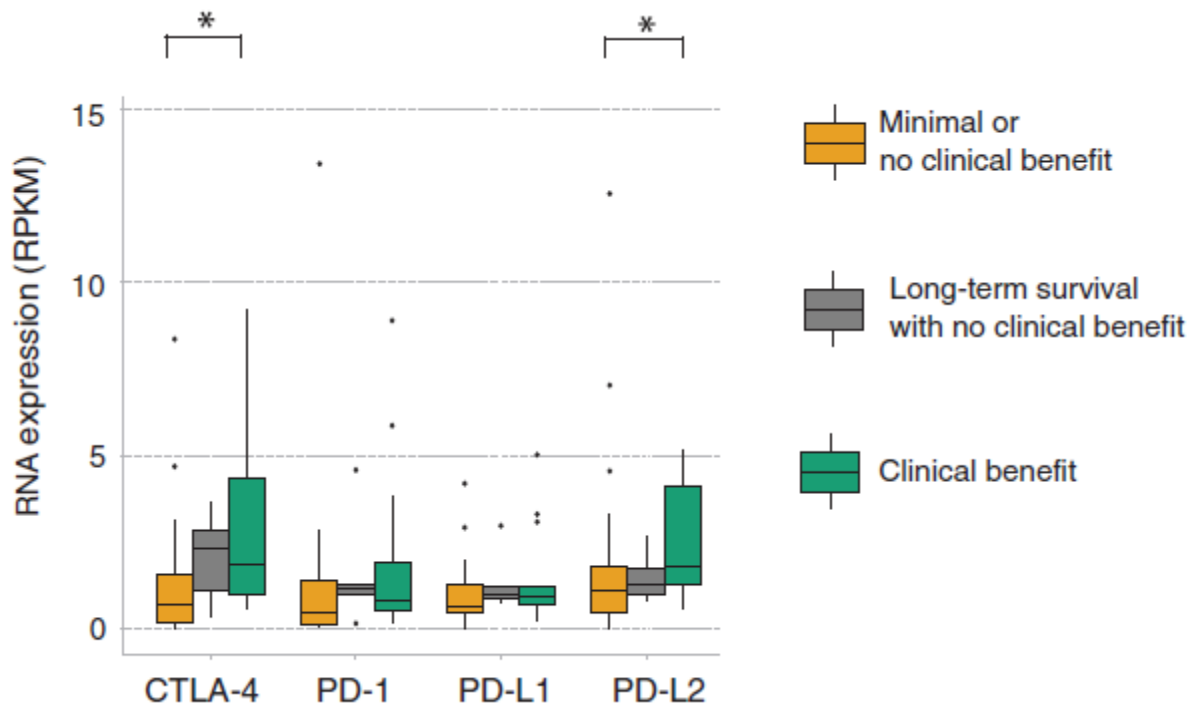
Donde se ha hecho un estudio como el que proponemos ha sido con muestras de melanoma, donde se ha visto que es el número de mutaciones y, sobretodo, de neoantígenos los que predicen la respuesta al ipilimumab<sup>71,108</sup>. Como ya se vio anteriormente, la expresión de CTLA-4 por IHQ en el tumor no se ha correlacionado con respuestas a los aCTLA-4, a diferencia de los aPD-1/aPD-L1 que sí que los tienen. A día de hoy no tampoco el *Tumor Mutational Burden* (TMB) se considera como un biomarcador predictor de los aCTLA-4, pero sí que está aprobado para el pembrolizumab.

En el estudio realizado por Eliezer Van Allen *et al.*<sup>108</sup>, se analizaron tres grupos de pacientes con melanoma metastásico tratados con ipilimumab: un grupo eran los que no habían tenido beneficio de la administración de ipilimumab, otro era los que habían vivido más de dos años pero con un SLP de menos de seis meses y el tercero eran los que sí que habían obtenido beneficio más claro del ipilimumab, habiendo respondido al tratamiento y con una supervivencia de más de dos años. Se vio que los dos primeros grupos tenían una carga mutacional y de neoantígenos menor que los largos

supervivientes, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.0076$  y  $p=0.027$ , respectivamente). Cabe destacar que había pacientes con valores atípicos en ambos grupos (muchos con alta carga mutacional o de neoantígenos en los no respondedores y poca carga de ambos en los largos respondedores).

Además de estudiar el número de mutaciones y neoantígenos, intentaron buscar neoantígenos que estuvieran presentes en varios pacientes de los largos respondedores y no en los otros dos grupos, ya que debido a la presencia de pacientes en ambos grupos con valores atípicos, la carga mutacional y de neoantígenos no sería suficiente para predecir la respuesta al ipilimumab. Solo identificaron 28 neoantígenos (~0.04%) de los 77,803 neoantígenos de todo el estudio que estuvieran en más de un paciente que había tenido beneficio clínico del ipilimumab pero que no estuviera presente en los pacientes que no habían respondido o que no habían tenido supervivencias duraderas<sup>108</sup>. Estos resultados se compararon con los de A Snyder *et al.*<sup>71</sup>, que habían identificado una firma de tetrapéptidos que estaba presente en varios pacientes respondedores y que, por tanto, se había asociado a beneficio a ipilimumab. No se encontraron estos tetrapéptidos en el grupo de los respondedores a ipilimumab del estudio, ni se encontró ningún neoantígeno o mutación que fuera común en todos los pacientes.

Por otro lado, realizaron secuenciación del RNA para comparar los genes realmente transcritos con los neoantígenos predichos por el *pipeline* bioinformático del *The Cancer Genome Atlas* (TCGA). En la mayoría de los pacientes los antígenos predichos por el TCGA sobreestimaba en 6320 a los que realmente estaban transcritos, y se dejaba de detectar 166 que sí que estaban expresados en los pacientes de estudio<sup>108</sup>. Además de la predicción de neoantígenos, la secuenciación del ARN daba información sobre genes inmunes que podrían estar expresados de manera diferente en los grupos de pacientes. Los genes *granzyme A* (GZMA) and *perforin* (PRF1) estaban sobreexpresados tanto en el grupo de los largos respondedores al ipilimumab que habían tenido beneficio clínico como los que habían progresado a los seis meses pero que había sobrevivido más de dos años, y apenas expresados en aquellos pacientes sin beneficio clínico alguno ( $p=0.042$ )<sup>108</sup>. También se vio que la expresión de CTLA-4 y de PD-L2 era estadísticamente significativa cuando se comparaba a los pacientes que habían tenido beneficio y respuestas duraderas con los que no habían tenido beneficio ( $p=0.033$  y  $p=0.041$ , respectivamente), pero no ocurría con el PD-1 o PD-L1 (Figura 47).



**Figura 47.** Expresión de RNA del CTLA-4, PD-1, PD-L1 y PD-L2 en pacientes con beneficio claro al ipilimumab, sin beneficio pero con larga supervivencia y sin beneficio. Los pacientes que mostraron beneficio al ipilimumab (en verde) mostraban niveles más altos de CTLA-4 y de PD-L2 que los pacientes sin beneficio (en amarillo), y eran estadísticamente significativos ( $p=0.033$  y  $p=0.041$ , respectivamente). Hay un punto en el CTLA-4 de los no respondedores que no se muestra porque es  $>50$  reads per kilobase per million (RPKM). Los \* en la parte superior indican una  $p < 0.05$ .

Fuente: imagen adaptada de Eliezer Van Allen *et al.*<sup>108</sup>.

Estos resultados nos hacen reflexionar sobre la dificultad que hay para poder usar unos pocos neoantígenos o intentar buscar mutaciones concretas para predecir la respuesta a los aCTLA-4. La disparidad de datos puede ser una de las razones por la que todavía no haya un CDx para los aCTLA-4 en el mercado, y que tampoco se haya podido producir tratamientos a base de neoantígenos sintéticos para poder inducir al sistema inmune de una manera más sutil que con las inmunoterapias.

Una observación de nuestro es que los resultados de NanoString en el ganglio no concuerdan con los de la IHQ. Una de las razones que pueden explicar esto es que la técnica NanoString no permite saber qué tipo de célula es la que expresa CTLA-4 o PD-1, ya que se extrae el ARN de toda la muestra conjuntamente. De hecho, en la IHQ del CTLA-4 no se tuvo en cuenta su expresión en los macrófagos, que también aparecían teñidos. Además, que los ganglios se clausterizen en dos grupos pero que no sea por la presencia de TILs en el tumor nos puede indicar dos cosas: que el NanoString no es la mejor técnica para estudiar este tipo de tejido, ya que está compuesto de

diferentes tipos de células en diferentes estructuras; o que hay otras razones subyacentes que desconocemos y que hace que los ganglios de estas pacientes sean diferentes. Las pacientes no estaban seleccionadas para correlacionar las variables del estudio con la SLP o SG, así que no se pudo hacer ningún análisis en este aspecto. Por otro lado, la variabilidad en los ganglios es mucho mayor que la del tumor, por lo que los dos clusters no presentan una diferencia de expresión tan clara como ocurre en la comparación entre tumores o entre el ganglio y el tumor.

Donde sería muy interesante hacer un estudio más amplio de expresión génica con NanoString que no solo cubriera genes inmunes, sería en el tumor primario. La empresa NanoString ha diseñado y validado un panel de 776 genes que incluye los diferentes subtipos de CM, las vías de señalización del RE, RP y HER2, y un estudio profundo del microambiente tumoral, entre otras firmas génicas (Tabla 23). Con este panel no solo se ampliaría el estudio del rol de las células y moléculas del sistema inmune, sino que también podríamos descifrar si hay otras vías moleculares propias de las células tumorales que nos puedan explicar las diferencias en la presencia o no de TILs al diagnóstico. Se compararía, entre otras cosas, si hay variación en porcentaje de los subtipos moleculares por PAM50 y por la clasificación de Burstein de los dos grupos. También incluye un estudio del MHC clase II, que es clave en la presentación de antígenos a través de las CPA.

**Tabla 23.** Clasificación de las diferentes firmas génicas que se cubren con los 776 genes del panel nCounter® de Cáncer de Mama 360™ de NanoString.

Tabla tomada de NanoString Technologies<sup>109</sup>.

BREAST CANCER SUBTYPING	BREAST CANCER RECEPTOR SIGNALING	TUMOR RESPONSIVENESS	TUMOR REGULATION	INHIBITORY TUMOR MECHANISMS	STROMAL FACTORS	INHIBITORY METABOLISM	ANTI-TUMOR IMMUNE ACTIVITY	INHIBITORY IMMUNE SIGNALING	IMMUNE CELL POPULATION ABUNDANCE
PAM50 Molecular Subtyping	ESR1 Gene Expression	Antigen Processing Machinery	Apoptosis	IDO1 Gene Expression	Endothelial Cells	Hypoxia	Tumor Inflammation Signature (TIS)	Inflammatory Chemokines	Cytotoxic Cell Abundance
Claudin-Low Subtyping	PGR Gene Expression	HRD	Proliferation	PD-L1 Gene Expression	Stromal Abundance		Cytotoxicity		CD8+ T Cell Abundance
Triple Negative Breast Cancer Subtyping	ERBB2 Gene Expression	BRCA	Differentiation				Interferon Gamma Signaling	TIGIT Gene Expression	Macrophage Abundance
	Estrogen Receptor Signaling	P53	FOXA1 Gene Expression				MHC Class II Antigen Presentation		Mast Cell Abundance
									Treg Abundance

Esta tesis, que implica diferentes pruebas y biomarcadores, nos ha hecho reflexionar sobre la inminente necesidad de tener un test de diagnóstico que nos permitiera identificar diferentes



biomarcadores. Actualmente los CDx en oncología están basados en pruebas de IHC (por ejemplo, HER2 o RE) o en secuenciación (BRCA, KRAS, etc.), y se hacen en el tumor primario. Los biomarcadores de inmunoterapia siguen también la misma línea: el PD-L1 es por IHQ, y los biomarcadores de inestabilidad de microsatélites (MSI, del inglés *microsatellite instability*) y el TMB, que están considerados como predictores de la terapia pembrolizumab en algunos tumores, se incluyen dentro del panel de secuenciación de FoundationOne® CDx, que cubre ya muchas terapias dirigidas<sup>110</sup>. Sin embargo, cada vez se están probando más inmunoterapias nuevas (LAG3, TIM3, OX-40, etc.) y en la mayoría de las ocasiones se hace un desarrollo paralelo de un posible CDx si se descubre un marcador predictor del tratamiento. Normalmente es la misma diana terapéutica o su ligando, y se mira en el tumor primario. En el caso del CTLA-4, su expresión en el tumor primario por IHQ no es predictivo de esta terapia. De hecho, una de las conclusiones más importantes de este trabajo es que es la expresión de este biomarcador en el ganglio linfático y no en el tumor es la que nos podría correlacionar con la respuesta al tratamiento, entendiéndola como un aumento en la migración de los linfocitos T al tumor primario.

Por otro lado, la cantidad de tejido podría ser un factor limitante si en el futuro necesitamos hacer varias IHQ y pruebas moleculares para saber cuál será la secuencia de tratamientos óptima para cada paciente. Esto implicaría validar tests multiplex de IHQ o la técnica de “teñir y desteñir”, que además de informarnos de la positividad del marcador, nos ayudaría a poder ver si, por ejemplo, son los linfocitos T CD8 los que expresan PD-L1 y qué posición ocupan respecto al tumor. Porque ya se ha visto que la presencia o no de diferentes células o moléculas y su localización nos informa de si el microambiente tumoral es más bien proinflamatorio o antiinflamatorio. Si el infiltrado inflamatorio, en el caso de que estuviera presente, está extenuado, nos va a costar más reactivarlo que si está todavía aún en fase efectora.

Estos test multiplex deberían de estar abiertos a que se usaran diferentes anticuerpos del mismo tipo, ya que cada fármaco tiene asociado un anticuerpo diferente (por ejemplo, pembrolizumab usa el clon 22C3 de dako, el atezolizumab el clon sp142 de ventana) y según los protocolos o prioridades de cada hospital se preferirán unos frente a otros ante un mismo escenario. Esta parece ser la pauta que están siguiendo los laboratorios, que además de hacer su propio fármaco desarrolla su propio anticuerpo para el CDx. En la Tabla 24 se muestran los diferentes fármacos aPD-1/aPD-L1 y su test de PD-L1 asociado, así como el tipo de célula que se valora y su uso actual. No se ha incluido el anticuerpo E1L3N de Cell Signaling ya que fue desarrollado fuera de los ensayos clínicos y no está relacionado con ningún fármaco.

**Tabla 24.** Tests de inmunohistoquímica de PD-L1 según los fármacos a los que está asociado, en qué células se valoran y el uso actual que tienen<sup>100,111</sup>.

Inhibidores PD-1/PD-L1	Test, anticuerpo	Tipo de célula	Prueba PD-L1 IHQ actual
Nivolumab (aPD-1)	Dako 28-8	Células tumorales	Test complementario
Pembrolizumab (aPD-1)	Dako 22C3	Células tumorales	Test CDx para varias indicaciones
Atezolizumab (aPD-L1)	Ventana sp142	Células tumorales y/o inmunes	Test CDx para CMTN y urotelial, complementario para otras indicaciones
Durvalumab (aPD-L1)	Ventana sp263	Células tumorales	Test complementario para cáncer urotelial*
Avelumab (aPD-L1)	Dako 73-10	Células tumorales	Aún no aprobado

\*El anticuerpo sp263 también permite ser usado en la Unión Europea como test CDx del pembrolizumab y complementario del nivolumab para cáncer de pulmón de células no pequeñas.

A diferencia de los fármacos, donde nunca se ha hecho un ensayo clínico comparando frente a frente los diferentes aPD-1/aPD-L1, para los tests de diagnóstico sí que se ha hecho una comparación de los tests, especialmente para su uso en cáncer de pulmón. El estudio comparativo más importante es el llamado “*Blueprint PD-L1 IHC assay comparisson project*”<sup>112</sup>, que cubre solo los cuatro primeros anticuerpos de la tabla. Los resultados de las otras comparaciones –que algunos sí que incluyen el 73-10 y el E1L3N–<sup>111</sup> varían con respecto a los obtenidos en el Blueprint, pero la mayoría concluye que las valoraciones del 28-8, 22C3 y sp263 son bastante concordantes, y que el sp142 suele tener una valoración más baja. De hecho, AstraZeneca ha aprovechado esta circunstancia e hizo una validación aprobado solo en la Unión Europea para que su anticuerpo se pudiera ser usado como test CDx para el pembrolizumab y complementario para el nivolumab en cáncer de pulmón<sup>100</sup>, ya que van por delante del desarrollo clínico que su fármaco, el durvalumab.

Nuestro estudio presentó ciertas limitaciones que se consiguieron solucionar de manera favorable, dando robustez al método empleado y a los resultados obtenidos:

- En algunas pacientes no era posible saber con exactitud cuál era el ganglio centinela (el más próximo al tumor), ya que varias de ellas se habían sometido a linfadenectomía. Se eligió un ganglio de entre todos del primer nivel que parecía más activo basándonos en el número de centros germinales.
- Había diferencia de edad y tamaño de tumor entre los dos grupos de pacientes, teniendo las pacientes con mayor infiltración de TILs una media y mediana de edad menor, y un tamaño

mayor de tumor. Se prefirió priorizar tener mayor número de pacientes a intentar balancear completamente la edad en los dos grupos, ya que solo se encontró 15 pacientes con TILs altas entre todas las pacientes estudiadas durante el cribado de TILs. Al no relacionar las valoraciones de los anticuerpos con la SLP o SG, no se consideró que la edad pudiera influir en el resultado, aunque sí que es verdad que el sistema inmune de las pacientes jóvenes suele ser más reactivo que el de las personas mayores. De hecho, posiblemente que esta sea una de las posibles causas por la que las pacientes jóvenes tienden a tener más TILs que pacientes mayores, como se ha visto ya en algunos estudios como el de Denkert *et al.*<sup>113</sup>. La diferencia de tamaño de tumor fue dado sobre todo porque había una paciente en el grupo de TILs altas que tenía un tumor de 50 mm, el resto eran igual o menor de 35 mm, como el del grupo TILs-.

- En algunos ganglios era muy difícil de ver con claridad las estructuras de cada parte, donde hubiera sido mejor haber valorado por separado la tinción de la zona paracortical, que es donde ocurre la presentación de antígenos a los linfocitos T. La tinción de PD-L1, PD-L2 y OX-40 se valoró todo conjuntamente ya que era difícil de distinguir la tinción de las otras células. Del CTLA-4 y PD-1 sí que se pudo evaluar solo en los linfocitos, que eran al fin y al cabo los dos biomarcadores principales que se quería evaluar la hipótesis principal.
- La tinción de OX-40 y sus resultados significativos han sido un poco sorprendentes. Por un lado, el OX-40 parece teñir por completo muchas células y estructuras, y esto nos podría hacer pensar en un primer momento que no estuviera bien optimizado, pero podemos ver claramente que han muestras del mismo tipo de tejido que se tiñen mucho y otras que no se tiñen nada. No se han hecho aún muchos estudios con técnicas IHQ sobre este marcador, y las terapias aOX-40 se encuentran actualmente en las primeras fases de ensayos clínicos. Por tanto, que los resultados hayan salido estadísticamente significativos en las tres comparaciones de ganglio, tumor y centro germinal podría tener o no significación clínica y habría que diseñar un estudio cuya hipótesis principal sea entender mejor el rol de este coestimulador. Como hemos visto anteriormente, hay un ensayo clínico en marcha que puede responder a estas cuestiones (NCT00900302)<sup>80</sup>.
- Hubiera sido informativo haber tenido una muestra de ganglios de pacientes sanos para comparar los porcentajes de tinciones de los anticuerpos y de los valores de CD8 y CD68 en una persona sin cáncer. El hospital no disponía de un banco de tejidos sanos por lo que tuvimos que desestimar tener un grupo control de las pruebas. Concluimos que esta decisión no afectaría al resultado ya que lo que buscábamos era la diferencia de expresión entre un

grupo y el otro, y la tinción en ganglios sanos nos hubiera ayudado a entender más aquellas comparaciones que no eran estadísticamente significativas.

- Solo los anticuerpos PD-1 y PD-L1 provenían de un kit comercial optimizado y validado, los otros tres se optimizaron en el laboratorio. A excepción del OX-40, de los otros dos anticuerpos no se llegó a conseguir una tinción muy fuerte que facilitara su evaluación. Sin embargo, se consiguió la concentración correcta y una tinción bastante específica (sin que llegara a teñir el fondo), por lo que con ayuda de la cámara del microscopio pudimos valorarlos adecuadamente.
- La presencia de los centros germinales y TLS podrían no verse dependiendo del corte del bloque. La cuantificación se hizo a partir de los cortes de dos anticuerpos y H&E para evitar que no pudiéramos ver CG y TLS en el caso de que estuvieran presentes y no se vieran en un corte específico del bloque de parafina.
- Para la técnica de NanoString, se incluyó toda el área del tumor, donde algunas muestras TILs- tenían infiltrado linfocitario periférico. En un primer momento se consideró que podría influir en el resultado, pero se concluyó que la superficie tumoral era mucho mayor que el infiltrado linfocitario periférico y que sería un porcentaje muy bajo de todo el RNA extraído.



# **CONCLUSIONES**

---



## CONCLUSIONES

1. Los linfocitos parecen estar retenidos en los ganglios linfáticos por el receptor CTLA-4 en pacientes que tienen niveles bajos de TILs en el tumor ( $p = 0.01$ ).
2. En el tumor, la inhibición de los linfocitos parece ocurrir a través del eje PD-1/PD-L1, habiendo más expresión de PD-L1 en las células tumorales de pacientes con altos niveles de TILs ( $p < 0.001$ ).
3. El B7.H4, B7.H3 y VEGF.A parecen estar más expresados en el tumor que en el ganglio, y sobre todo en los tumores sin infiltración de TILs.
4. Las pacientes con altos niveles de TILs en el tumor tienen más expresión de PD-L2 en los centros germinales ( $p = 0.03$ ), éstos son más grandes y numerosos, y además tienen más TLS en el tumor que las pacientes con niveles bajos de TILs.
5. Los ganglios de las pacientes con niveles altos de TILs en el tumor parecen tener más expresión de CD68 (marcador de los macrófagos) y de CD8 (linfocitos T citotóxicos) sugiriendo que hay más presentación de antígenos en estas pacientes.





**LÍNEAS DE FUTURO**

---



## LÍNEAS DE FUTURO

Se sugiere, por tanto, a raíz de los resultados obtenidos en esta tesis, los siguientes estudios:

- Testar los anti-CTLA-4 antes de la cirugía y/o de la neoadyuvancia con biopsias pre- y post-tratamiento en pacientes con TILs <5%, para que podamos medir si conseguimos aumentar las TILs 10% o más. Sería conveniente dejar el ensayo clínico abierto a abrir nuevas cohortes si la hipótesis de la aplicación de aCTLA-4 se cumple. Se podría valorar concomitarlo o secuenciarlo con otras inmunoterapias para asegurarnos que esos linfocitos que migran al tumor no se desactiven en el lugar de acción, según vayan saliendo resultados de ensayos clínicos o de investigaciones preclínicas/translacionales. También se podrían concomitar con coestimuladores como el OX-40 para potenciar la activación del sistema inmune.
- Hacer secuenciación del exoma en las muestras de tumor para comparar mutaciones e identificar posibles neoantígenos inmunogénicos usando sistemas informáticos como pVAC-Seq o MuPeXI. De esta manera podríamos entender mejor si las pacientes con altos niveles de TILs han tenido más mutaciones, si éstas producen neoantígenos más inmunoatrayentes, y si esto ha hecho que haya más los linfocitos T CD8 estimulados.
- Estudiar las muestras de tumor con el panel de Cáncer de Mama 360™ de NanoString para entender mejor las diferencias de los dos grupos. Este panel validado permite hacer una ampliación del estudio de las vías moleculares relacionadas con el microambiente tumoral y la inflamación, así como un estudio completo de la biología del tumor, que no se había hecho en esta tesis.
- Realizar un estudio de IHQ de los biomarcadores B7.H4 y B7.H3 (CD276) en el tumor primario de ambos grupos de pacientes, para comparar su expresión con la de PD-L1. No se conoce mucho el rol de estos biomarcadores en CM, pero ha sido muy sorprendente que esté mucho más expresado en el tumor que en el ganglio, y más en las pacientes con TILs bajo. La expresión de PD-L1 ha sido en general baja en nuestro estudio ya que solo se ha valorado en las células tumorales.
- Realizar un estudio de IHQ del PD-L2 en el ganglio centinela en el mismo contexto que las pacientes de este trabajo usando un anticuerpo con tinción más intensa combinado con un anticuerpo de identificación de células dendríticas (CD1a), macrófagos (CD68) y linfocitos T (CD8), y aumentando el número de muestras en la medida de lo posible.



# **BIBLIOGRAFÍA**

---

## BIBLIOGRAFÍA

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424. doi:10.3322/caac.21492
2. Jemal A, Siegel R, Ward E. Cancer Statistics, 2010. *CA Cancer J Clin.* 2010;(60):277-300. doi:10.1002/caac.20073.Available
3. ELSTON CW, ELLIS IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology.* 1991;19(5):403-410. doi:10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x
4. American Joint Committee on Cancer. Cancer Staging Manual. 8th Edition.
5. SE S, Adams S, ML D, 2000 P et al-N. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000;2(10):1354-1360. <http://dx.doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.1061>.
6. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, 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;24:2206-2223. doi:10.1093/annonc/mdt303
7. Elizabeth Hammond MH, Hayes DF, Dowsett M, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 2010;134:907-1101.
8. Wolff AC, McShane LM, Hammond MEH, et al. Human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *Arch Pathol Lab Med.* 2018;142(11):1364-1382. doi:10.5858/arpa.2018-0902-SA
9. Koboldt DC, Fulton RS, McLellan MD, et al. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2012;490:61-70. doi:10.1038/nature11412
10. Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol.* 2011;5(1):5-23. doi:10.1016/j.molonc.2010.11.003
11. Paik S, Tang G, Shak S, et al. Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol.* 2006;24(23):3726-3734. doi:10.1200/JCO.2005.04.7985
12. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C. A Multigene Assay to Predict Recurrence of Tamoxifen-Treated, Node-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2004;351(27):2817-2826.
13. Cardoso F, van't Veer LJ, Bogaerts J, et al. 70-Gene Signature as an Aid to Treatment Decisions in Early-Stage Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2016;375(8):717-729. doi:10.1056/NEJMoa1602253
14. Lehmann BDB, Bauer J a J, Chen X, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest.* 2011;121(7):2750-2767. doi:10.1172/JCI45014DS1
15. Burstein MD, Tsimelzon A, Poage GM, et al. Comprehensive Genomic Analysis Identifies Novel Subtypes and Targets of Triple-negative Breast Cancer. *Clin Cancer Res.* 2016;21(7):1688-1698. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-0432.Comprehensive
16. Kumar P, Aggarwal R. An overview of triple-negative breast cancer. *Arch Gynecol Obstet.* 2016;(293):247-269. doi:10.1007/s00404-015-3859-y
17. Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive

- breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: A population-based study from the California Cancer Registry. *Cancer*. 2007;109(9):1721-1728. doi:10.1002/cncr.22618
18. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, et al. Triple-negative breast cancer: Clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res*. 2007;13(15):4429-4434. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-3045
  19. Abul K Abbas AHL. *Cellular and Molecular Immunology*.; 2005.
  20. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Inmunología Celular y Molecular*. Vol 6ª Edición.; 2008. doi:10.1007/s13398-014-0173-7.2
  21. Solomon, Berg, Martin. *Biología*. 9ª Edición. CENGAGE learning; 2014.
  22. Dempke WCM, Fenchel K, Uciechowski P, Dale SP. Second- and third-generation drugs for immuno-oncology treatment—The more the better? *Eur J Cancer*. 2017;74:55-72. doi:10.1016/j.ejca.2017.01.001
  23. Dempke WCM, Fenchel K, Uciechowski P, Dale SP. Second- and third-generation drugs for immuno-oncology treatment—The more the better? *Eur J Cancer*. 2017;74:55-72. doi:10.1016/j.ejca.2017.01.001
  24. Romero-palomo F, Sanchez-cordon PJ, Agency PH, Pedrera M. Funciones y clasificación de las células dendríticas. 2011;(March 2014).
  25. Bordon Y. Natural killer cells spy greedy tumours. *Nat Rev Immunol*. 2018;18:77. <http://dx.doi.org/10.1038/nri.2018.2>.
  26. David JR, Terhorst C. *Organs and Cells of the Immune System*. 3rd Editio. ACP medicine; 2003.
  27. Owen JA, Punt J, Stranford SA. *Kuby Inmunología*. 7ª Edición. McGraw-Hill; 2014.
  28. Ravelli A, Roviello G, Cretella D, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes and breast cancer: Beyond the prognostic and predictive utility. *Tumor Biol*. 2017;39(4):1-8. doi:10.1177/1010428317695023
  29. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The Three Es of Cancer Immunoediting. *Annu Rev Immunol*. 2004;22(1):329-360. doi:10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803
  30. Nadine S, Esrom Catarina P, de Mello RA, Antoniou G, Veloso AF. Potential role of immunotherapy in advanced non-small-cell lung cancer. *Onco Targets Ther*. 2016;Volume 10:21-30. doi:10.2147/ott.s90459
  31. International Immuno-Oncology Biomarker Working Group. TILs in Breast Cancer. [www.tilsinbreastcancer.org](http://www.tilsinbreastcancer.org).
  32. Ruffell B, Au A, Rugo HS, Esserman LJ, Hwang ES, Coussens LM. Leukocyte composition of human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci*. 2012;109(8):2796-2801. doi:10.1073/pnas.1104303108
  33. Hendry S, Salgado R, Gevaert T, et al. Assessing Tumor-infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors: A Practical Review for Pathologists and Proposal for a Standardized Method from the International Immunooncology Biomarkers Working Group: Part 1: Assessing the Host Immune Response, TILs in Invasi. *Adv Anat Pathol*. 2017;24(5):235-251. doi:10.1097/PAP.000000000000162
  34. Winslow S, Leandersson K, Edsjö A, Larsson C. Prognostic stromal gene signatures in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2015;17:23. doi:10.1186/s13058-015-0530-2
  35. Mahmoud SMA, Paish EC, Powe DG, et al. Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29(15):1949-1955. doi:10.1200/JCO.2010.30.5037



36. SE Stanton, Adams S, ML Disis. Variation in the incidence and magnitude of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer subtypes: A systematic review. *JAMA Oncol.* 2016;2(10):1354-1360. <http://dx.doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.1061>.
37. Burugu S, Asleh-Aburaya K, Nielsen TO. Immune infiltrates in the breast cancer microenvironment: detection, characterization and clinical implication. *Breast Cancer.* 2017;24(1):3-15. doi:10.1007/s12282-016-0698-z
38. Hollmén M, Roudnicky F, Karaman S, Detmar M. Characterization of macrophage - Cancer cell crosstalk in estrogen receptor positive and triple-negative breast cancer. *Sci Rep.* 2015;5:1-10. doi:10.1038/srep09188
39. Sznol M, Chen L. Antagonist antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the treatment of advanced human cancer. *Clin cancer Res.* 2014;19(5):1021-1034. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-2063.Antagonist
40. Gu-Trantien C, Loi S, Garaud S, et al. CD4+ follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *J Clin Invest.* 2013;123(7):1-20. doi:10.1172/JCI67428.Traditionally
41. 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(2):259-271. doi:10.1093/annonc/mdu450
42. Hendry S, Salgado R, Gevaert T, et al. Assessing Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors: A Practical Review for Pathologists and Proposal for a Standardized Method from the International Immuno-Oncology Biomarkers Working Group: Part 2: TILs in Melanoma, Gastrointestinal Tract Carcinom. *Adv Anat Pathol.* 2017;24(6):311-335. doi:10.1097/PAP.000000000000161
43. 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(1):105-113. doi:10.1200/JCO.2009.23.7370
44. Loi S, Michiels S, Salgado R, et al. Tumor infiltrating lymphocytes are prognostic in triple negative breast cancer and predictive for trastuzumab benefit in early breast cancer: Results from the FinHER trial. *Ann Oncol.* 2014;25(8):1544-1550. doi:10.1093/annonc/mdu112
45. Adams S, Gray RJ, Demaria S, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancers from two phase III randomized adjuvant breast cancer trials: ECOG 2197 and ECOG 1199. *J Clin Oncol.* 2014;32(27):2959-2967. doi:10.1200/JCO.2013.55.0491
46. Demaria S, Volm MD, Shapiro RL, et al. Development of Tumor-infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer after Neoadjuvant Paclitaxel Chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 2001;7:3025-3030.
47. Ladoire S, Mignot G, Dabakuyo S, et al. In situ immune response after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer predicts survival. *J Pathol.* 2011;224(3):389-400. doi:10.1002/path.2866
48. Denkert C, Darb-Esfahani S, Loibl S, Anagnostopoulos I, Jöhrens K. Anti-cancer immune response mechanisms in neoadjuvant and targeted therapy. *Semin Immunopathol.* 2011;33:1-11. doi:10.1007/s00281-011-0261-0
49. 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 Pilot Study of the Mechanism of Action of Preoperative Trastuzumab in Patients with Primary Operable Breast Tumors Overe. *Clin Cancer Res.* 2004;10:5650-5655. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0225
50. Andre F, Dieci M V., Dubsy P, et al. Molecular pathways: involvement of immune pathways in

- the therapeutic response and outcome in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2013;19(1):28-33. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-2701
51. Roberto Salgado, MD, PhD, Carsten Denkert, MD, PhD CC et al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Associations With Pathological Complete Response and Event-Free Survival in HER2-Positive Early-Stage Breast Cancer Treated With Lapatinib and Trastuzumab: a secondary analysis of the NeoALTTO trial. *JAMA Oncol.* 2015;1(4):448-454. doi:10.1001/jamaoncol.2015.0830.Tumor-Infiltrating
  52. Loi S, Michiels S, Salgado R, et al. Abstract S1-05: Tumor infiltrating lymphocytes (TILs) indicate trastuzumab benefit in early-stage HER2-positive breast cancer (HER2+ BC). *Cancer Res.* 2013;73(24 Supplement):S1-05 LP-S1-05. [http://cancerres.aacrjournals.org/content/73/24\\_Supplement/S1-05.abstract](http://cancerres.aacrjournals.org/content/73/24_Supplement/S1-05.abstract).
  53. Dieci MV, Bisagni G, Cagossi K, et al. Abstract PD1-1: Tumor infiltrating lymphocytes and correlation with outcome in the Cher-LOB study. *Cancer Res.* 2015;75(9 Supplement):PD1-1 LP-PD1-1. [http://cancerres.aacrjournals.org/content/75/9\\_Supplement/PD1-1.abstract](http://cancerres.aacrjournals.org/content/75/9_Supplement/PD1-1.abstract).
  54. Denkert C, Von Minckwitz G, Brase JC, 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):983-991. doi:10.1200/JCO.2014.58.1967
  55. Issa-Nummer Y, 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. doi:10.1371/journal.pone.0079775
  56. West NR, Milne K, Truong PT, Macpherson N, Nelson BH, Watson PH. Tumor-infiltrating lymphocytes predict response to anthracycline-based chemotherapy in estrogen receptor-negative breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2011;13(6):1-13. doi:10.1186/bcr3072
  57. Wein L, Savas P, Luen SJ, Virassamy B, Salgado R, Loi S. Clinical Validity and Utility of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Routine Clinical Practice for Breast Cancer Patients: Current and Future Directions. *Front Oncol.* 2017;7(156). doi:10.3389/fonc.2017.00156
  58. Dieci M V., Criscitiello C, Goubar A, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes on residual disease after primary chemotherapy for triple-negative breast cancer: A retrospective multicenter study. *Ann Oncol.* 2014;25(3):611-618. doi:10.1093/annonc/mdt556
  59. Loi S, Sirtaine N, Piette F, et al. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98. *J Clin Oncol.* 2013;31(7):860-867. doi:10.1200/JCO.2011.41.0902
  60. Pruneri G, Gray KP, Vingiani A, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) are a powerful prognostic marker in patients with triple-negative breast cancer enrolled in the IBCSG phase III randomized clinical trial 22-00. *Breast Cancer Res Treat.* 2016;158(2):323-331. doi:10.1007/s10549-016-3863-3
  61. Dieci M V., Mathieu MC, Guarneri V, et al. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in two phase III randomized adjuvant breast cancer trials. *Ann Oncol.* 2015;26(8):1698-1704. doi:10.1093/annonc/mdv239
  62. Loi S, Drubay D, Adams S, et al. Abstract S1-03: Pooled individual patient data analysis of stromal tumor infiltrating lymphocytes in primary triple negative breast cancer treated with anthracycline-based chemotherapy. *Cancer Res.* 2016;76(4 Supplement):S1-03 LP-S1-03. [http://cancerres.aacrjournals.org/content/76/4\\_Supplement/S1-03.abstract](http://cancerres.aacrjournals.org/content/76/4_Supplement/S1-03.abstract).
  63. Edith A. Perez, M.D., Karla V. Ballman PD et al. Association of Stromal Tumor-Infiltrating Lymphocytes With Recurrence-Free Survival in the N9831 Adjuvant Trial in Patients With

- Early-Stage HER2-Positive Breast Cancer. *JAMA Oncol.* 2016;2(1):56-64.  
doi:10.1038/nrg3575.Systems
64. Kohrt HE, Nouri N, Nowels K, Johnson D, Holmes S, Lee PP. Profile of immune cells in axillary lymph nodes predicts disease-free survival in breast cancer. *PLoS Med.* 2005;2(9):0904-0919. doi:10.1371/journal.pmed.0020284
  65. Seidl M, Bader M, Vaihinger A, et al. Morphology of Immunomodulation in Breast Cancer Tumor Draining Lymph Nodes Depends on Stage and Intrinsic Subtype. *Sci Rep.* 2018;8(1):1-12. doi:10.1038/s41598-018-23629-3
  66. DeWeerd S. Bacteriology: A caring culture. *Nature.* 2013;504(7480):5-6. doi:10.1038/504S4a
  67. Ott PA, Hodi FS, Robert C. CTLA-4 and PD-1/PD-L1 Blockade: New Immunotherapeutic Modalities with Durable Clinical Benefit in Melanoma Patients. *Clin Cancer Res.* 2013;19(19):5300 LP - 5309. <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/19/19/5300.abstract>.
  68. Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am J Clin Oncol.* 2016;39(1):98-106. doi:10.1097/COC.0000000000000239
  69. Roach C, Zhang N, Corigliano E, et al. Development of a Companion Diagnostic PD-L1 Immunohistochemistry Assay for Pembrolizumab Therapy in Non-Small-cell Lung Cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2016;24(6):392-397. doi:10.1097/PAI.0000000000000408
  70. Pentcheva-Hoang T, Egen JG, Wojnoonski K, Allison JP. B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse. *Immunity.* 2004;21(3):401-413. doi:10.1016/j.immuni.2004.06.017
  71. Alexandra Snyder, M.D., Vladimir Makarov, M.D., Taha Merghoub PD et al. Genetic Basis for Clinical Response to CTLA-4 Blockade in Melanoma. *N Engl J Med.* 2014;371(23):2189-2199. doi:10.1056/nejmoa1406498
  72. Youngnak P, Kozono Y, Kozono H, et al. Differential binding properties of B7-H1 and B7-DC to programmed death-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;307(3):672-677. doi:10.1016/S0006-291X(03)01257-9
  73. Guo M, Brumlik MJ, Pardoll D, et al. Costimulator B7-DC Attenuates Strong Th2 Responses Induced by *Nippostrongylus brasiliensis*. *J Immunol.* 2010;184(4):2086-2094. doi:10.4049/jimmunol.0804051
  74. García-Tejido P, Cabal ML, Fernández IP, Pérez YF. Tumor-infiltrating lymphocytes in triple negative breast cancer: The future of immune targeting. *Clin Med Insights Oncol.* 2016;10:31-39. doi:10.4137/CMO.S34540
  75. Sholl LM, Aisner DL, Allen TC, et al. Programmed death ligand-1 immunohistochemistry-A new challenge for pathologists: A perspective from members of the pulmonary pathology society. *Arch Pathol Lab Med.* 2016;140(4):341-344. doi:10.5858/arpa.2015-0506-SA
  76. Schmid P, Adams S, Rugo HS, et al. Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2018:NEJMoa1809615. doi:10.1056/NEJMoa1809615
  77. Harris KJ, Kwon ED, Liu X, et al. B7-H1 Expressed by Activated CD8 T Cells Is Essential for Their Survival. *J Immunol.* 2011;187(11):5606-5614. doi:10.4049/jimmunol.1003976
  78. Kean LS, Guo L, Fife BT, et al. Programmed death ligand-1 expression on donor T cells drives graft-versus-host disease lethality. *J Clin Invest.* 2016;126(7):2642-2660. doi:10.1172/jci85796
  79. Yearley JH, Gibson C, Yu N, et al. PD-L2 expression in human tumors: Relevance to anti-PD-1 therapy in cancer. *Clin Cancer Res.* 2017;23(12):3158-3167. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-1761
  80. NIH. ClinicalTrials.gov Database. <https://clinicaltrials.gov/>.

81. Michael Croft, Takanori So, Wei Duan and PS. The Significance of OX40 and OX40L to T cell Biology and Immune Disease. *Immunol Rev.* 2009;229(1):173-191. doi:10.1111/j.1600-065X.2009.00766.x.The
82. Willoughby J, Griffiths J, Tews I, Cragg MS. OX40: Structure and function – What questions remain? *Mol Immunol.* 2017;83:13-22. doi:10.1016/j.molimm.2017.01.006
83. Polesso F, Weinberg AD, Moran AE. Late-Stage Tumor Regression after PD-L1 Blockade Plus a Concurrent OX40 Agonist. *Cancer Immunol Res.* 2019;7(2):269 LP - 281. doi:10.1158/2326-6066.CIR-18-0222
84. Zaravinos A. An updated overview of HPV-associated head and neck carcinomas. *Oncotarget.* 2014;5(12):3956-3969. doi:10.18632/oncotarget.1934
85. Technologies N. nCounter® Elements™ XT Reagents USER MANUAL FOR LABORATORY USE. 2018;(June).
86. Promega. Maxwell 16 LEV RNA FFPE Kit Quick Protocol FB167. 2014.
87. Tawfik O, Kimler BF, Karnik T, Shehata P. Clinicopathological correlation of PD-L1 expression in primary and metastatic breast cancer and infiltrating immune cells. *Hum Pathol.* 2018;80:170-178. doi:10.1016/j.humphath.2018.06.008
88. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(4):252-264.
89. Hodi FS, Day SJO, McDermott DF, et al. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *N Engl J Med.* 2010;363(8):711-723. doi:10.1056/NEJMoa1003466.Improved
90. Vonderheide RH, Lorusso PM, Khalil M, et al. Tremelimumab in combination with exemestane in patients with advanced breast cancer and treatment-associated modulation of inducible costimulator expression on patient T cells. *Clin Cancer Res.* 2010;16(13):3485-3494. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-0505
91. Janakiram M, Abadi YM, Sparano JA, Zang X. T Cell Coinhibition and Immunotherapy in Human Breast Cancer. *Discov Med.* 2012;14(77):229-236. doi:10.1016/j.micin.2011.07.011
92. Blank CU, Rozeman EA, Fanchi LF, et al. Neoadjuvant versus adjuvant ipilimumab plus nivolumab in macroscopic stage III melanoma. *Nat Med.* 2018;24(11):1655-1661. doi:10.1038/s41591-018-0198-0
93. Tarhini A, Lin Y, Lin H, et al. Neoadjuvant ipilimumab (3 mg/kg or 10 mg/kg) and high dose IFN- $\alpha$  in locally/regionally advanced melanoma: safety, efficacy and impact on T-cell repertoire. *J Immunother Cancer.* 2018;6(1):112. doi:10.1186/s40425-018-0428-5
94. M. Chalabi, L.F. Fanchi, J.G. Van den Berg, G.L. Beets, M. Lopez-Yurda, A.G. Aalbers, C. Grootsholten, P. Snaebjornsson, M. Maas, M. Mertz, E. Nuijten, M. Kuiper, M. Kok, M.E. Van Leerdam, T.N. Schumacher, E.E. Voest JBH. LBA37\_PR - Neoadjuvant ipilimumab plus nivolumab in early stage colon cancer. *Ann Oncol.* 2018;29(Supplement 8).
95. McArthur HL, Diab A, Page DB, et al. A pilot study of preoperative single-dose ipilimumab and/or cryoablation in women with early-stage breast cancer with comprehensive immune profiling. *Clin Cancer Res.* 2017;22(23):5729-5737. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-0190.A
96. Schmid P, Park YH, Muñoz-Couselo E, et al. Pembrolizumab (pembro) + chemotherapy (chemo) as neoadjuvant treatment for triple negative breast cancer (TNBC): Preliminary results from KEYNOTE-173. *J Clin Oncol.* 2017;35(15\_suppl):556. doi:10.1200/JCO.2017.35.15\_suppl.556
97. Schmid P, Park YH, Muñoz-Couselo E, Kim S-B, Sohn J, Im S-A, Holgado E, Foukakis T, Kuemmel S, Dent R, Yin L, Ding Y, Tryfonidis K CJ. Abstract PD5-01: KEYNOTE-173: Phase

- 1b multicohort study of pembrolizumab (Pembro) in combination with chemotherapy as neoadjuvant treatment for triple-negative breast cancer (TNBC). *Cancer Res.* 2018.
98. Puzstai L, Hofstatter EW, Chung GG, et al. Durvalumab (MEDI4736) concurrent with nab-paclitaxel and dose dense doxorubicin cyclophosphamide (ddAC) as neoadjuvant therapy for triple negative breast cancer (TNBC). *J Clin Oncol.* 2018;36(15\_suppl):586. doi:10.1200/JCO.2018.36.15\_suppl.586
  99. Schmid P, Cortes J, Bergh JCS, et al. KEYNOTE-522: Phase III study of pembrolizumab (pembro) + chemotherapy (chemo) vs placebo + chemo as neoadjuvant therapy followed by pembro vs placebo as adjuvant therapy for triple-negative breast cancer (TNBC). *J Clin Oncol.* 2018;36(15\_suppl):TPS602-TPS602. doi:10.1200/JCO.2018.36.15\_suppl.TPS602
  100. Diagnostics R. Ventana PD-L1 tests. <https://diagnostics.roche.com/global/en/products/product-category/companion-diagnostics.html>.
  101. Peng C, Hu Q, Yang F, Zhang H, Li F, Huang C. BCL6-Mediated Silencing of PD-1 Ligands in Germinal Center B Cells Maintains Follicular T Cell Population. *J Immunol.* 2019;202(3):704 LP - 713. doi:10.4049/jimmunol.1800876
  102. Tahiliani V, Hutchinson TE, Abboud G, Croft M, Salek-Ardakani S. OX40 Cooperates with ICOS To Amplify Follicular Th Cell Development and Germinal Center Reactions during Infection. *J Immunol.* 2017;198(1):218 LP - 228. doi:10.4049/jimmunol.1601356
  103. Piccart-Gebhart M, Craciun L, Lodewyckx J-N, et al. Tumor-infiltrating lymphocyte composition, organization and PD-1/ PD-L1 expression are linked in breast cancer. *Oncoimmunology.* 2016;6(1):e1257452. doi:10.1080/2162402x.2016.1257452
  104. Sabel MS, Carvajal-Hausdorf DE, Schalper KA, et al. Association of B7-H4, PD-L1, and tumor infiltrating lymphocytes with outcomes in breast cancer. *npj Breast Cancer.* 2018;4(1):1-8. doi:10.1038/s41523-018-0095-1
  105. Schadendorf D, Hodi FS, Robert C, et al. Pooled Analysis of Long-Term Survival Data From Phase II and Phase III Trials of Ipilimumab in Unresectable or Metastatic Melanoma. *J Clin Oncol.* 2015;33(17):1889-1894. doi:10.1200/JCO.2014.56.2736
  106. Hundal J, Carreno BM, Petti AA, et al. pVAC-Seq: A genome-guided in silico approach to identifying tumor neoantigens. *Genome Med.* 2016;8(1):1-11. doi:10.1186/s13073-016-0264-5
  107. Bjerregaard AM, Nielsen M, Hadrup SR, Szallasi Z, Eklund AC. MuPeXI: prediction of neo-epitopes from tumor sequencing data. *Cancer Immunol Immunother.* 2017;66(9):1123-1130. doi:10.1007/s00262-017-2001-3
  108. Eliezer M, Van Allen, Miao D, Ai S et. Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma HHS Public Access. *Science (80- ).* 2015;350(6257):207-211. doi:10.1126/science.aad0095
  109. nCounter® Breast Cancer 360™ Panel. <https://www.nanostring.com>.
  110. FoundationOne® CDx. Foundation Medicine. <https://www.foundationmedicine.com/genomic-testing/foundation-one-cdx>.
  111. Cristina Teixidó, Noelia Vilariño RR and NR. PD-L1 expression testing in non-small cell lung cancer. *Ther Adv Med Oncol.* 2018;10:1-17. doi:10.1177/https
  112. Hirsch FR, McElhinny A, Stanforth D, et al. PD-L1 Immunohistochemistry Assays for Lung Cancer: Results from Phase 1 of the Blueprint PD-L1 IHC Assay Comparison Project. *J Thorac Oncol.* 2017;12(2):208-222. doi:10.1016/j.jtho.2016.11.2228
  113. Denkert C, von Minckwitz G, Darb-Esfahani S, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *Lancet Oncol.* 2018. doi:10.1016/S1470-2045(17)30904-X

# **AGRADECIMIENTOS**

---

## AGRADECIMIENTOS

Esta tesis no hubiera sido posible sin el apoyo inestimable de muchas personas, y sin la generosidad de las pacientes que nos permitieron investigar con sus muestras.

En primer lugar, quería agradecer a mis directores de tesis, por su gran disponibilidad y paciencia con la que me han apoyado en todo este tiempo. Gracias, Vicente, por todo lo que me has enseñado y por transmitirme tu pasión por el microscopio. He disfrutado mucho valorando los TILs y descifrando los nuevos biomarcadores inmunes tan novedosos pero aún desconocidos. Gracias Eva por todo lo aprendido sobre el cáncer y sobre la inmunoterapia, y por todo el cariño recibido. Y, por supuesto, gracias al excepcional e inolvidable Dr. Javier Cortés por haberme dado la oportunidad de realizar este proyecto tan interesante y que tanto me gusta. Gracias también por tu generosidad y por tu acompañamiento y mentoría a lo largo de la tesis. Ojalá esta investigación tenga finalmente un impacto en estas pacientes que tanto lo necesitan.

A Susana Muñoz, por darme la oportunidad de trabajar en este hospital, y por todo tu apoyo en darme el impulso final para realizar el doctorado.

A José Jiménez y Teresa Moliné por vuestra ayuda para encontrar los bloques y preparar las láminas. He aprendido mucho con vosotros sobre anatomía patológica e inmunohistoquímica.

A Ana Vivancos y su equipo por vuestra colaboración en este proyecto, y por todo lo que he aprendido con vosotros sobre genómica. Gracias en especial a Ginevra por tu paciencia y ayuda con las muestras.

A Rodrigo y Guillermo por vuestra colaboración con el análisis de datos y por ayudarme a comprender e interpretar mejor los resultados obtenidos.

A Aleix Prat, Laia Paré y Patricia Galván por el análisis tan exquisito de los datos, y por ayudarme a comprender mejor el NanoString. Gracias también por colaborar con nosotros en la continuación del proyecto para que podamos seguir descubriendo cosas nuevas sobre estas pacientes.

A Leticia de Mattos por su cariño y profesionalidad científica y médica. Muchas gracias por tu gran disponibilidad a colaborar con nosotros para continuar estudiando a estas pacientes y así poder profundizar a nivel genómico.

Gracias a todas las jefas, coordinadores, médicos, enfermeras y auxiliares de la Unidad de Mama por hacerme sentir día a día parte de un equipo fantástico. Trabajar con vosotros es formidable, y el resultado se ve cada día en las caras de las pacientes. Gracias especialmente a la Dra. Esther Zamora por compartir las pacientes de los ensayos de inmunoterapia conmigo, así como tus conocimientos sobre el cáncer de mama y sus tratamientos.

A Maribel, David y Carina por todo el cariño y apoyo que he recibido por vuestra parte desde que entré en el hospital. He disfrutado mucho compartiendo el despacho con vosotros y me habéis hecho sentir muy a gusto en el hospital.

Al Dr. Joan Carles, Rafael Morales, y al equipo de médicos y coordinadores de Genitourinario por todo lo que me habéis enseñado, y por sentirme tan acogida y valorada en vuestro grupo.

A Alex Sierra por todo lo que me has enseñado y me has hecho reflexionar sobre la investigación clínica y sobre lo que necesitan los pacientes.

A mis amigos de Valladolid y Barcelona, por todas las experiencias vividas que han contribuido a enriquecer mi personalidad

A mis queridísimos amigos de California, por todo lo que me ayudaron en mi aventura americana, que tanto ha significado para mí personal y profesionalmente.

Y por último, los más importantes de todos, mi familia. A mi querida abuela Mena y a mi querido Tío Pedro, que, aunque ya no estéis os sigo recordando con muchísimo cariño. Y a mis queridos padres y hermanos, que siempre han estado ahí tanto en los momentos buenos como en los malos, y de los que he recibido un apoyo incondicional en todas las decisiones que he tomado a lo largo de los años.

Ángela