UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Tesis de Maestría

CARACTERIZACIÓN DEL INFILTRADO INMUNE TUMORAL EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA

Manuela Llano León

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá, Colombia
2022

CARACTERIZACIÓN DEL INFILTRADO INMUNE TUMORAL EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA

Manuela Llano León

Tesis de Maestría

Maestría en Ciencias – Bioquímica
Énfasis en investigación

Director:

Carlos Alberto Parra López

Grupo de Investigación:
Laboratorio de Inmunología y Medicina Traslacional
Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina

Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Universidad Nacional de Colombia
Bogotá, Colombia
2022

Para mi mamá Luz Stella,

Te amo, te venero, te idolatro.

"*Somos el resultado de los libros que leemos,*

Los cafés que disfrutamos,

Y las personas que amamos"

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi mamá Luz Stella, por tanto amor. Porque, aunque no está aquí puedo sentir su amor todos los días. Gracias por mimarme tanto siempre. Gracias por ayudarme a cumplir mis metas y por permitirme creer que todo lo que sueño puede hacerse realidad. Gracias por apoyarme desde el primer momento en que dije que quería ser científica. Por ti soy la persona que soy. Aquí estoy, cumpliéndote todas las promesas que te hice.

A mis dos hermanas Cris y Clau, y mi cuñado Carlos, son los mejores regalos que mi mama me dejo, les agradezco todos los días por su inmenso apoyo y amor. A mis tías Irma, María y Patricia, su amor me da las fuerzas para seguir todos los días. Y a mis sobrinas Andre e Isa, son la razón por la que cada día quiero ser una mejor persona. *Los amo*, son mis personas favoritas del mundo, son mi lugar seguro y mi hogar. Gracias por darme ganas de volver siempre, por mimarme tanto, tanto, tanto. Gracias por recibirme con frijoles y abrazos cuando vuelvo. Soy lo que soy por ustedes. También quiero agradecer a mis tíos: Diego, Gustavo, Orlando e Irma López. Mis primos: Laura, Juan Camilo, María Camila, Ecala y Caro. Le doy gracias a la vida todos los días por la familia que somos.

Quiero agradecerle inmensamente a mis amigues del laboratorio. Nicolás, con quien empezamos este camino juntos y que se ha convertido en mi mejor amigo de la vida. Gracias por los consejos, gracias por nunca decir que no, gracias por llegar con un vino, cerveza o helado a la hora que fuera necesario. Por acompañarme en todas mis crisis, inclusive si tampoco sabía qué hacer con las suyas y por celebrar mis logros siempre. Gracias por enseñarme la verdadera amistad. A Ivon, por enseñarme a ser mejor persona cada día, por las risas y los dramas en el laboratorio y en la vida. A Laura, por ser tan incondicional, por pilotearme la ansiedad, por calmarme y ayudarme en todos mis pendientes, por tomar café conmigo. A Oscar, por ser de las personas que más admiro, su gran inteligencia y su capacidad de querer tanto a sus amigos. A Esteban por acompañarme en las inmunohistoquímicas y hacerme los días de laboratorio menos tortuosos. A María V por su gran compañía, por estar pendiente y escucharme siempre, así hable siempre de lo mismo. Sin ustedes este camino habría sido imposible de recorrer. Los amo inmensamente.

A Silvana, por ser mi soulmate, porque agradezco todos los días recuperarla en mi vida. Gracias por hacer escenas del rey León con Muffi y por dar saltos de princesa para hacerme la vida más feliz. Gracias por querer probar todos los tacos de la ciudad, y por todas las tardes viendo cualquier bobada y comiendo helado o genovesa. Quédate a mi lado siempre.

A Sara, por ser la mejor amiga de la vida, por estar pendiente de mi aun cuando me pierdo por días, por su amor y apoyo siempre. Porque desde los 14 tomábamos capuchino con dos sobres de azúcar, y ahora somos catadoras de café que saben reconocer orígenes y métodos de preparación. La vida siempre es más linda cuando me tomo un café contigo.

A Daniela C. por estar pendiente de mí siempre, porque así nos alejemos por momentos, siempre está. Gracias por seguirme queriendo así, no te vayas nunca. A Mike por todas las tardes de *trabajación* y por estar siempre pendiente.

A mis amigos de Ferias, Karen y Daniela porque llegaron siendo amigas prestadas, pero ahora son mías y agradezco muchísimo tenerlas en mi vida. A Juancho, por quererme y por mimarme tanto. A Santi, Sebas, Mateo, Gafu, Ramón y Pauli, gracias por ser tan lindos, por mantener pendientes, por los mensajes diarios y por todos los *compartir*. Espero que sigamos compartiendo mucho más.

A Santi, por todo el amor que me dio y por todo el camino que me ayudo a recorrer. A Majilo, Pipo y Rigo, por haber hecho parte de mi vida y ser mi segunda familia por tanto tiempo.

Al doctor Carlos Parra, por ser un gran director. Gracias por conocer tanto a sus estudiantes y saber cómo manejarlos. Gracias por tenerme paciencia, gracias por enseñarme que a veces es mejor no responder, aunque nunca le hiciera caso y dijera todo lo que pienso en frente de todos. Gracias por su apoyo en todos los momentos difíciles que tuve durante esta maestría, por entenderme como soy y no presionarme. Por formar esta gran escuela de inmunología, de la cual me siento muy afortunada de hacer parte. Gracias profe porque lo que se aprende en este laboratorio no es solo Ciencia.

A David, Alejandra y Anamaria, por enseñar sin reservas, por recibirnos en el laboratorio con los brazos abiertos, por tomarse siempre el tiempo para explicar todo con detalles. Gracias a David Becerra por enseñarme y ayudarme tanto en mi tesis de maestría, por empezar este camino en el laboratorio y acompañarme hasta que estuve lista para continuarlo. A Holman Hernández y a David Santiago Padilla por su valiosa ayuda en la parte bioinformática. A todos los profesores, especialmente a la profe Myriam Navarrete por su incondicional apoyo en estos últimos años.

Gracias a la Universidad Nacional de Colombia, por recibirme cuando llegue a Bogota hace casi 10 años, y ser mi hogar. Por formarme como persona y por abrirme los ojos frente a las realidades sociales de este país.

Gracias a Minciencias y a la Universidad Nacional por el apoyo financiero a este proyecto de investigación. Y a todas las pacientes que generosamente aceptaron participar.

A todos ustedes y los que tal vez no nombre: *gracias*.

Resumen

Titulo: Caracterización del infiltrado inmune tumoral en pacientes con cáncer de mama

En Colombia, el cáncer de mama es el tipo de cáncer con mayor incidencia y prevalencia en la mujer, ocupando el tercer puesto en mortalidad a nivel nacional. La vigilancia del tumor en pacientes con cáncer de mama por las células del sistema inmune -inmunovigilancia- es importante para el control del desarrollo tumoral. Reportes en la literatura sugieren que el esquema de quimioterapia neoadyuvante con Doxorrubicina y Ciclofosfamida induce un tipo especial de muerte en las células tumorales conocida como muerte celular inmunogénica, activando las poblaciones inmunes intratumorales y favoreciendo la inmunovigilancia de este tumor, lo cual, probablemente contribuye a una mejor respuesta clínica al tratamiento antitumoral.

Estudios demuestran que el microambiente tumoral es un factor determinante en el pronóstico de los pacientes con cáncer. Aunque en los tumores de cáncer de mama se ha descrito la importancia de analizar el infiltrado inmune para evaluar la presencia de poblaciones efectoras y de poblaciones reguladoras, este tipo de análisis para proponer marcadores pronósticos de evolución y de respuesta al tratamiento han sido limitados.

En este trabajo estandarizamos una metodología de inmunohistoquímica secuencial sobre lámina única para la caracterización de poblaciones del sistema inmune innato y adaptativo como: i) Leucocitos totales CD45+ ii) Macrófagos CD68+ III). Linfocitos B CD20+ iv). Linfocitos T totales CD3+ y v). Linfocitos T Citotóxicos CD8+, con relación a las células tumorales evaluadas con el marcador Pankeratinas. Se demostró que esta técnica representa una alternativa costo-efectiva para mapear el microambiente tumoral, que permite monitorear la infiltración de estas poblaciones antes y después de la quimioterapia y que en este trabajo nos permitió evidenciar un aumento significativo de la infiltración de células CD45 positivas después del tratamiento neoadyuvante.

Adicionalmente, utilizamos la herramienta CIBERSORTx para medir 22 subpoblaciones inmunes, con datos disponibles en el Genome European Archive por medio del análisis del transcriptoma tumoral. Se encontraron cambios significativos en diferentes poblaciones: primero, un aumento después de un ciclo de quimioterapia de las fracciones relativas de Linfocitos T CD8, Linfocitos T CD4 quiescentes y de Linfocitos T reguladores, las cuales disminuyeron al terminar el esquema

de neoadyuvancia. Segundo, las fracciones relativas de Linfocitos B de memoria, Macrófagos M1, y Linfocitos T Foliculares disminuyeron después de un ciclo y al final del tratamiento. Por último, las Células Dendríticas activadas, los Macrófagos M2 y los Mastocitos aumentaron después de un ciclo, y al finalizar el tratamiento.

Por otra parte, se realizó una revisión sistemática que nos permitió incluir 32 artículos para una síntesis cualitativa de la evidencia y 9 artículos, para una síntesis cuantitativa por medio de meta-análisis, en los cuales encontramos una disminución significativa de la infiltración de TILs (T Infiltrating Lymphocytes) evaluados morfológicamente en láminas de hematoxilina & eosina y del marcador FoxP3 medido por inmunohistoquímica tradicional, lo que sugiere una disminución de las poblaciones de linfocitos T reguladores en respuesta a la NAC (neoadyuvant chemotherapy). Las poblaciones de Linfocitos T totales CD3+, Linfocitos T colaboradores CD4+ y Linfocitos T citotóxicos CD8+ no cambiaron significativamente en respuesta al tratamiento.

Por último, y con la intención de evaluar el impacto de los marcadores evaluados en la pCR (Pathological Clinical Response), se realizó un análisis PCA (Principal Component Analysis) con las variables correspondientes a la información clínica de las pacientes y los puntajes de las marcaciones de inmunohistoquímica de las cinco poblaciones inmunes evaluadas. En este análisis las variables fueron procesadas de forma directa y posteriormente optimizadas filtrando las variables de mayor peso. Sin embargo, ninguno de estos análisis nos permitió establecer correlaciones entre los marcadores evaluados y el pronóstico clínico de las pacientes. Sin embargo, realizando un análisis con dos variables seleccionadas: i) infiltrado de células CD45+ el cual aumentó significativamente pos-NAC; ii) infiltración de células CD68+ que mostró una tendencia al aumento, y las variables de tamaño y grado de reducción tumoral, fue posible evidenciar una segregación diferencial de las muestras pre y pos-NAC.

Palabras clave: (Microambiente inmune tumoral - Cáncer de mama – Inmunovigilancia – Quimioterapia neoadyuvante**).**

Abstract

Title: Tumor immune infiltrate characterization in breast cancer patients

Breast cancer is the third deadliest cancer in Colombia, having the highest incidence and prevalence in women. Tumor surveillance in breast cancer patients by immune system cells -immunosurveillance- it's a key factor to control tumor growth. A growing body of evidence suggest that a neoadjuvant chemotherapy scheme with Doxorubicin and Cyclophosphamide induces a special type of tumor cell death known as immunogenic cell death, which activates intratumoral immune populations and favours immunosurveillance of this tumor, probably contributing to a better clinical response to antitumor treatment.

Studies show that the tumor microenvironment is a determining factor in the prognosis of cancer patients. Although in breast cancer tumors the importance of analyzing the immune infiltrate to evaluate the presence of effector and regulatory populations has been described, the discovery and validation of prognostic biomarkers in response to treatment is still limited.

In this work we standardized a sequential immunohistochemistry methodology for the characterization of innate and adaptive immune system populations such as: i) Total CD45+ leukocytes ii) CD68+ macrophages iii). CD20+ B cells iv). CD3+ total T cells and v).CD8+ cytotoxic T cells, in relation to tumor cells evaluated with the Pankeratin marker. Our results showed that this technique represents a cost-effective alternative to map the tumor microenvironment, which allowed us to evaluate the infiltration of these populations before and after chemotherapy, finding a significant increase in the infiltration of CD45 positive cells after neoadjuvant treatment.

Additionally, we used the CIBERSORTx tool to measure twenty-two immune subpopulations, with data available in the genome European archive, by analyzing the tumor transcriptome. Significant changes were found in different populations: first, an increase after one cycle of NAC of the relative fractions of: CD8 T cells, quiescent CD4 T cells and regulatory T lymphocytes; decreasing at the end of the treatment. Second, the relative fractions of memory B lymphocytes, M1 macrophages, and follicular T cells decreased after one cycle and at the end of treatment. Finally, activated Dendritic Cells, M2 Macrophages, and Mast Cells increased after one cycle, and also at the end of treatment.

On the other hand, we performed a systematic review that allowed us to include 32 articles for a qualitative synthesis of the evidence, and 9 articles, for a quantitative synthesis by meta-analysis, in which we found a significant decrease in the infiltration of TILs, evaluated morphologically on hematoxylin and eosin slides, as well as the reduction FoxP3+ cells, measured by traditional immunohistochemistry, suggesting a decrease in the populations of regulatory T lymphocytes in response to NAC. Total CD3+ T lymphocyte, CD4+ helper T lymphocyte and CD8+ cytotoxic T lymphocyte populations did not change significantly in response to treatment.

Finally with the intention of correlate the evaluated markers and pCR (Pathological Clinical Response), a PCA (Principal Component Analysis) analysis was performed with the variables corresponding to the clinical information of the patients and the scores of the immunohistochemical results of the five immune populations evaluated. In the first analysis, the variables were processed directly, and in the second the variables were optimized by filtering the ones with the greatest weight. However, none of these analyzes allowed us to establish correlations between the markers evaluated and the clinical prognosis of the patients. Lastly, analysis with two selected variables: i) CD45+ cell infiltrate which increased significantly post-NAC; ii) infiltration of CD68+ cells that showed an increasing trend, was performed, among with the variables of size and degree of tumor reduction, showing a differential segregation of the pre- and post-NAC samples**.**

Keywords: (Tumor immune microenvironment – Breast Cancer – Immunosurveillance – Neoadjuvant chemotherapy**)**.

Contenido

1. Introducción 20

2. Planteamiento del problema y justificación. 22

3. Marco teórico 24
3.1 Cáncer de mama 24
3.2 Inmunovigilancia y teoría de las 3 “E” 24
3.3 Infiltrado inmune tumoral. 27
3.4 Inmunosupresión en el microambiente tumoral 28
3.5. Importancia del estudio de la composición inmune del microambiente tumoral. 30
3.6. Efecto de la quimioterapia neoadyuvante (NAC) en las células tumorales 31
3.7. Microambiente inmune Tumoral en Cáncer de Mama en Respuesta a la NAC 32
3.8. Inmunohistoquímica multiparamétrica secuencial sobre una sola lámina. 34
3.9. Respuesta al tratamiento antitumoral con quimioterapia neoadyuvante (NAC) 34

4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN 36

5. OBJETIVOS 37
5.1 Objetivo general 37
5.2. Objetivos específicos: 37

6. METODOLOGÍA 38
6.1. Estandarización de la técnica de Inmunohistoquímica secuencial sobre lámina única (ISSLU) en cortes de amígdala 39
6.2. Revisión sistemática 41
6.3. Diseño del estudio Instituto Nacional de Cancerología 43
6.3.1. Procedimientos experimentales 46
6.3.2. Conducción del estudio 47
6.4. Análisis de transcriptoma con CIBERSORTx 48
6.5. Análisis de componentes principales 49
6.6. Análisis estadístico 50

7. RESULTADOS 51
7.1. Capítulo 1. Estandarización de la técnica de inmunohistoquímica secuencial sobre lámina única 51
7.2. Capítulo 2. Caracterización del infiltrado inmune tumoral en muestras pre-quimioterapia y muestras pos quimioterapia. 62

7.2.1. La NAC disminuye la infiltración de TILs y de Tregs medidas por FoxP3: Revisión sistemática y meta-análisis. 63
7.2.2. Caracterización del infiltrado inmune por medio de ISSLU 83
7.2.3. Caracterización de las poblaciones inmunes evaluadas por CIBERSORTx ...87
7.3. Capítulo 3. Correlaciones entre el desenlace clínico y la evaluación de las poblaciones infiltrantes pre y pos-NAC por medio de la ISSLU 93

DISCUSIÓN.....99

Apropiación Social y divulgación del Conocimiento 110

REFERENCIAS 112

Índice Figuras

Figura 1. ***Proceso de Inmunoedición y Teoría de las 3 "E".*** Las células transformadas son reconocidas y eliminadas por el sistema inmune, pero quedan en estado latente aquellas que no expresaban estás moléculas, evitando ser reconocidas y eliminadas por el sistema inmune. Finalmente, estás células latentes escapan de la presión inmune y proliferan, generando un microambiente inmunosupresor. Tomada y modificada de Schreiber, *et al*., (2011). Imagen realizada con el software libre Biorender.....25
Figura 2. ***Esquema metodológico****.* Actividades realizadas para responder a los tres objetivos específicos.....38
Figura 3. ***Ejemplos semi-cuantificación*****.** Fotografías de referencia para puntear las biopsias y mastectomías de acuerdo al porcentaje de células positivas para cada marcación. A. Marcación negativa correspondiente a un puntaje de cero. B. Marcación con un 1 a 33% de células positivas correspondientes a un puntaje de 1. C. Marcación con un 33 a 66% de células positivas correspondientes a un puntaje de 2 y D. Marcación de más del 66% de las células correspondientes a un puntaje de 3. 47
Figura 4. ***Diagrama metodológico CIBERSORTx***. La plataforma de CIBERSORTx utiliza una matriz de referencia con perfiles transcripcionales de 22 subtipos inmunes. Esta matriz fue realizada por los autores por medio de single cell RNA seq. Los datos del transcriptoma deben ser normalizados a TPM, y finalmente el programa los compara con la matriz de referencia para definir las fracciones relativas de cada población dentro del transcriptoma en estudio Tomada de [26].....49
Figura 5. ***Estandarización marcación secuencial*****:** Diagrama de flujo marcación de Inmunohistoquímica secuencial sobre lámina única 52
Figura 6.***Sistema de detección****.*** Anticuerpos utilizados para la detección de las proteína de interés. EnVision System Dako. Tomado y modificado de [99].....53
Figura 7. ***Mantenimiento de la antigenicidad - Marcación secuencial CD45*****.** Aumento de 200X de un corte de amígdala de 3um para estandarización de la marcación secuencial del anticuerpo CD45. a. Primera marcación. b. Demarcación más tinción con hematoxilina. c. Segunda marcación. d. Demarcación más incubación con AEC y tinción con hematoxilina. e. Tercera marcación. f. Cuarta marcación y g. Quinta marcación. 53
Figura 8. ***Mantenimiento de la antigenicidad - Marcación secuencial CD20****.* Aumento de 200X de un corte de amígdala de 3um para estandarización de la marcación secuencial del anticuerpo CD20. **a.** Primera marcación. **b.** Demarcación más tinción con hematoxilina. **c.** Segunda marcación. **d.** Demarcación más incubación con AEC y tinción con hematoxilina. **e.** Tercera marcación. **f.** Cuarta marcación y **g.** Quinta marcación.....54
Figura 9. ***Mantenimiento de la antigenicidad - Marcación secuencial CD68****.* Aumento de 200X de un corte de amígdala de 3um para estandarización de la marcación secuencial del anticuerpo CD68. **a.** Primera marcación. **b.** Demarcación más tinción con hematoxilina. **c.**

Segunda marcación. **d.** Demarcación más incubación con AEC y tinción con hematoxilina. **e.** Tercera marcación. **f.** Cuarta marcación y **g.** Quinta marcación. 55
Figura 10. ***Mantenimiento de la antigenicidad - Marcación secuencial CD3****.* Aumento de 200 X de un corte de amígdala de 3um para estandarización de la marcación secuencial del anticuerpo CD3. **a.** Primera marcación. **b.** Tercera marcación **c.** Segunda marcación. **d.** Demarcación más tinción con hematoxilina. **e.** Cuarta marcación. **f.** Demarcación más incubación con AEC y tinción con hematoxilina. y **g.** Quinta marcación. 56
Figura 11. ***Mantenimiento de la antigenicidad - Marcación secuencial CD8****.* Aumento de 200X de un corte de amígdala de 3um para estandarización de la marcación secuencial del anticuerpo CD8. **a.** Primera marcación. **b.** Demarcación más tinción con hematoxilina. **c.** Segunda marcación. **d.** Demarcación más incubación con AEC y tinción con hematoxilina. **e.** Tercera marcación. **f.** Cuarta marcación y **g.** Quinta marcación. 57
Figura 12. ***Mantenimiento de la antigenicidad - Marcación secuencial Pankeratinas****.* Aumento de 200X de un corte de amígdala de 3um para estandarización de la marcación secuencial del anticuerpo Pankeratinas. **a.** Primera marcación. **b.** Demarcación más tinción con hematoxilina. **c.** Segunda marcación. **d.** Demarcación más incubación con AEC y tinción con hematoxilina. **e.** Tercera marcación. **f.** Cuarta marcación y **g.** Quinta marcación. 58
Figura 13. ***Evaluación del efecto estérico entre anticuerpos empezando con CD3****.* Aumento de 200X de un corte de amígdala de 3um para estandarización de la marcación secuencial de anticuerpos en diferente orden. **a.** Marcación CD3. **b.** Demarcación más tinción con hematoxilina. **c.** Marcación CD68. **d.** Demarcación más incubación con AEC y tinción con hematoxilina. **e.** Marcación CD20. **f.** Marcación CD45 y **g.** Marcación CD3. 59
Figura 14 . ***Evaluación del efecto estérico entre anticuerpos empezando con CD8*****.** Aumento de 200X de un corte de amígdala de 3um para estandarización de la marcación secuencial de anticuerpos en diferente orden. **a.** Marcación CD8. **b.** Demarcación más tinción con hematoxilina. **c.** Marcación CD20. **d.** Demarcación más incubación con AEC y tinción con hematoxilina. **e.** Marcación CD45. **f.** Marcación CD3 y **g.** Marcación CD8. 59
Figura 15. ***Evaluación del efecto estérico entre anticuerpos empezando con CD20****.* Aumento de 200X de un corte de amígdala de 3um para estandarización de la marcación secuencial de anticuerpos en diferente orden. **a.** Marcación CD20. **b.** Demarcación más tinción con hematoxilina. **c.** Marcación CD3. **d.** Demarcación más incubación con AEC y tinción con hematoxilina. **e.** Marcación CD8. **f.** Marcación CD68 y **g.** Marcación CD20. 60
Figura 16 ***Evaluación del efecto estérico entre anticuerpos empezando con CD45*****.** Aumento de 200X de un corte de amígdala de 3um para estandarización de la marcación secuencial de anticuerpos en diferente orden. **a.** Marcación CD45. **b.** Demarcación más tinción con hematoxilina. **c.** Marcación CD8. **d.** Demarcación más incubación con AEC y tinción con hematoxilina. **e.** Marcación CD68. **f.** Marcación CD20 y **g.** Marcación CD45. 61
Figura 17 ***Evaluación del efecto estérico entre anticuerpos empezando con CD68.*** **Aumento** de 200X de un corte de amígdala de 3um para estandarización de la marcación secuencial de anticuerpos en diferente orden. **a.** Marcación CD68. **b.** Demarcación más tinción con hematoxilina. **c.** Marcación CD45. **d.** Demarcación más incubación con AEC y tinción con hematoxilina. **e.** Marcación CD3. **f.** Marcación CD8 y **g.** Marcación CD68. 61

Figura 18. ***Sobreposición de marcadores.*** Aumento de 200X de cortes de amígdala marcados secuencialmente con todos los marcadores. La sobreposición se realiza utilizando el programa Fiji de ImageJ, asignándole filtros de colores a cada tinción con AEC. 62
Figura 19. ***Diagrama de flujo de la revisión con criterios prisma.*** *L*a estrategia de búsqueda inicial permitió la identificación de 633 artículos, después de remover los duplicados, 449 artículos fueron revisados por título y resumen, se eliminaron 317 y 132 artículos fueron revisados a texto abierto. 32 artículos fueron incluidos en la síntesis cualitativa y 9 en los meta-análisis. 64
Figura 20. ***Evaluación del riesgo de sesgo*** *a***.** Resumen de la evaluación del riesgo de sesgo de los artículos incluidos. **b.** Evaluación del riesgo de sesgo individual. Se utilizo la herramienta de evaluación de calidad del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (**NIH**) para estudios antes y después (Pre-Post) sin grupo de control, con la adición de cuatro criterios: i) Descripción explícita de evaluación y aprobación del protocolo por un comité de ética, o si las pacientes firmaron un consentimiento informado, ii) Descripción de los anticuerpos, clones y marcas comerciales utilizados según aplique, y iii) presentación explícita de los resultados sea en el texto, tablas o gráficas. Esta tabla de riesgo de sesgo modificada tuvo 3 instancias de revisión independientes. 66
Figura 21. ***Meta-análisis TILs.*** Influencia de NAC en la densidad de TILs de tumores BC. Forest plot para los resultados de la densidad de TILs antes y después de NAC. El forest plot muestra la SMD (cuadrados) y el intervalo de confianza del 95 % de los estudios individuales. El rombo en cada gráfico indica la estimación general y el intervalo de confianza del 95%. 68
Figura 22. ***Meta-análisis linfocitos*** *T CD3+* Influencia de NAC en la densidad de LT-CD3+ de tumores BC. Forest plot para los resultados de la densidad de LT-CD3+ antes y después de NAC. El forest plot muestra la SMD (cuadrados) y el intervalo de confianza del 95 % de los estudios individuales. El rombo en cada gráfico indica la estimación general y el intervalo de confianza del 95%. 74
Figura 23. ***Meta-análisis linfocitos T CD4+*** Influencia de NAC en la densidad de LT-CD4+ de tumores BC. Forest plot para los resultados de la densidad de LT-CD4+ antes y después de NAC. El forest plot muestra la SMD (cuadrados) y el intervalo de confianza del 95 % de los estudios individuales. El rombo en cada gráfico indica la estimación general y el intervalo de confianza del 95%. 75
Figura 24. ***Meta-análisis conteo de linfocitos T CD8+*****.** Influencia de NAC en la densidad de LT-CD8+ de tumores BC. Forest plot para los resultados de la densidad de LT-CD8+ antes y después de NAC. El forest plot muestra la SMD (cuadrados) y el intervalo de confianza del 95 % de los estudios individuales. El rombo en cada gráfico indica la estimación general y el intervalo de confianza del 95%. 76
Figura 25. ***Meta-análisis infiltración de linfocitos T CD8+.*** Influencia de NAC en el conteo de LT-CD8+ de tumores BC. Forest plot para los resultados del conteo de LT-CD8+ antes y después de NAC. El forest plot muestra la SMD (cuadrados) y el intervalo de confianza del 95 % de los estudios individuales. El rombo en cada gráfico indica la estimación general y el intervalo de confianza del 95%. 77

Figura 26. ***Meta-análisis linfocitos FoxP3+.*** Influencia de NAC en la densidad de Foxp3 de tumores BC. Forest plot para los resultados de la densidad de FoxP3 antes y después de NAC. El forest plot muestra la SMD (cuadrados) y el intervalo de confianza del 95 % de los estudios individuales. El rombo en cada gráfico indica la estimación general y el intervalo de confianza del 95%. 77
Figura 27. ***Semi-cuantificación de la infiltración de CD45.*** Análisis de grupos de la a. Cantidad y b. Intensidad de la marcación (Mann-Whitney). Análisis pareados de la c. Cantidad y b. Intensidad (Wilcoxon test). 84
Figura 28. ***Semi-cuantificación de la infiltración de CD68.*** Análisis de grupos de la a. Cantidad y b. Intensidad de la marcación (Mann-Whitney). Análisis pareados de la c. Cantidad y b. Intensidad (Wilcoxon test). 84
Figura 29. ***Semi-cuantificación de la infiltración de CD20.*** Análisis de grupos de la a. Cantidad y b. Intensidad de la marcación (Mann-Whitney). Análisis pareados de la c. Cantidad y b. Intensidad (Wilcoxon test). 84
Figura 30. ***Semi-cuantificación de la infiltración de CD3.*** Análisis de grupos de la a. Cantidad y b. Intensidad de la marcación (Mann-Whitney). Análisis pareados de la c. Cantidad y b. Intensidad (Wilcoxon test). 85
Figura 31. ***Semi-cuantificación de la infiltración de CD8.*** Análisis de grupos de la a. Cantidad y b. Intensidad de la marcación (Mann-Whitney). Análisis pareados de la c. Cantidad y b. Intensidad (Wilcoxon test). 85
Figura 32. ***Sobreposición de marcaciones.*** Aumento de 100X y 200X de una biopsia marcada con los anticuerpos anti-CD8 y anti-Pankeratinas. Sobreposición de ambas marcaciones. 86
Figura 33. ***Sobreposición de marcaciones****.* Aumento de 200X de una biopsia marcada con los anticuerpos anti-CD45, anti-CD68 y anti-Pankeratinas. Sobreposición de las tres marcaciones. 86
Figura 34 ***Fracciones relativas a LB*****.** Fracciones relativas evaluadas por CIBERSORTx para las poblaciones de LB- Naive, LB-Memoria y Células plasmáticas. Los análisis pareados se hicieron con la prueba Wilcoxon (a, b y c) y los análisis de grupo se hicieron con la prueba Kruskal Wallis (d, e y f). 88
Figura 35. ***Fracciones relativas a LT*****.** Fracciones relativas evaluadas por CIBERSORTx para las poblaciones de LT-CD8, LT-CD4 quiescentes y LT-CD4 activados. Los análisis pareados se hicieron con la prueba Wilcoxon (a, b y c) y los análisis de grupo se hicieron con la prueba Kruskal Wallis (d, e y f). 88
Figura 36. ***Fracciones relativas a subpoblaciones de LT***. Fracciones relativas evaluadas por CIBERSORTx para las poblaciones de LT foliculares, Tregs y LTγδ. Los análisis pareados (a, b y c) se hicieron con la prueba Wilcoxon y los análisis de grupo se hicieron con la prueba Kruskal-Wallis (d, e y f). 89
Figura 37. ***Fracciones relativas de NKs, Monocitos y DCs****.* Fracciones relativas evaluadas por CIBERSORTx para las poblaciones de NK activadas, Monocitos y DCs activadas. Los análisis pareados (a, b y c) se hicieron con la prueba Wilcoxon y los análisis de grupo se hicieron con la prueba Kruskal-Wallis (d, e y f). 90

Figura 38. ***Fracciones relativos de las subpoblación de Mφ*.** Fracciones relativas evaluadas por CIBERSORTx para las poblaciones de Mϕ-M0/M1/M2. Los análisis pareados (a, b y c) se hicieron con la prueba Wilcoxon y los análisis de grupo se hicieron con la prueba Kruskal-Wallis (d, e y f).....91
Figura 39. *Fracciones relativas de mastocitos y neutrófilos.* Fracciones relativas evaluadas por CIBERSORTx para las poblaciones de Mϕ-M0/M1/M2. Los análisis pareados (a, b y c) se hicieron con la prueba Wilcoxon y los análisis de grupo se hicieron con la prueba Kruskal-Wallis (d, e y f).....92
Figura 40. *Subtipo moleculares y estadio de diagnóstico*. Porcentaje de pacientes correspondientes a: **a.** los cuatro subtipos moleculares y b. estadio de diagnóstico, incluidas en la cohorte del Instituto Nacional de Cancerología. 93
Figura 41. ***Reducción del tamaño tumoral*.** Evaluación del tamaño tumoral al momento de la biopsia (pre) y de la cirugía (pos). a. análisis de grupo de las muestras con la prueba de Mann-Whitney. b. análisis pareado de las muestras con la prueba Wilcoxon.....94
Figura 42. *Análisis de componentes principales con todas las variables*. Resultados de la reducción de variables a dos componentes. a. Gráfica del pesa de cada variable en los dos componentes. b. Representación de los valores de cada pacientes en los dos componentes principales.....95
Figura 43. ***Análisis de componente principales optimizado con las variables de mayor peso***. Segundo análisis de componentes principales utilizando las variables con mayor valor en los componentes principales.....97
Figura 44. *Análisis de componentes principales con variables de relevancia experimental*. Segundo análisis de componentes principales utilizando las variables con mayor valor en los componentes principales. 97

Índice tablas

Tabla 1. ***Listado de anticuerpos utilizados***. Anticuerpos que se estandarizaron en láminas de amígdala y se utilizaron para evaluar el infiltrado tumoral en biopsias y especímenes quirúrgicos de cáncer de mama. Todos los anticuerpos son marca Dako y están estandarizados y validados para el diagnóstico clínico. 40
Tabla 2. *Artículos incluidos en la revisión sistemática*. 32 artículos incluidos en la síntesis cualitativa de la información. 66
Tabla 3. *Tendencias en el cambio de TILs pre y pos-NAC*. De los 32 artículos incluidos, 17 midieron la infiltración de TILs antes y después de la NAC. 68
Tabla 4. *Tabla de tendencias células*. De los 32 artículos incluidos, 24 evaluaron alguna población celular por IHQ o por perfil transcripcional antes y después de la NAC.....72
Tabla 5. *Tabla de tendencias de checkpoints y de citoquinas*.....81
Tabla 6. *Desenlace clínico*. Variables clínicas antes y después de la NAC de las pacientes del Instituto Nacional de Cancerología incluidas en el estudio. 94
Tabla 7. ***Matriz de componentes rotados*.** Resultados del primer análisis con todas las variables incluías y su respectivo peso en los dos componentes principales. Las variables en cursiva y negrita fueron las seleccionadas para optimizar el análisis de componentes principales pues tenían un valor mayor a 0.5 en alguno de los dos componentes. 96

Listado de siglas

APC células presentadoras de antígeno

DAMPS patrones moleculares asociados a daños

DCs. Células dendríticas

DFS sobrevida libre de enfermedad

ER receptor de estrógenos

Esquema A/C Doxorrubicina y ciclofosfamida

HER2 receptor del factor de crecimiento epidermal humano

ISSLU inmunohistoquímica secuencia sobre lámina única

LT linfocitos T

LT-CD4 linfocitos T ayudadores

LT-CD8 linfocitos T citotóxicos

Mϕ macrófagos

MDSC células mieloides supresoras

NAC quimioterapia neoadyuvante

NK células natural killer

OS sobrevida total

PR receptor de progestágenos

RIs receptores inhibitorios

TAMs macrófagos asociados al tumor

TILs linfocitos infiltrantes de tumor

TIME microambiente inmune tumoral

TINs neutrófilos infiltrantes de tumos

TME microambiente tumoral

TNM T: tumor, N: nódulos regionales, M: metástasis distantes

TPM transcritos por millón

Tregs linfocitos T reguladores

1. Introducción

Los ambientes tumorales son un grupo de elementos interconectados y organizados en distintos niveles, cuya definición y delimitación suponen un reto conceptual y experimental [1], sin embargo, en este trabajo se definió al infiltrado inmune del microambiente tumoral (TME) como la presencia de leucocitos, así como sus productos, marcadores de superficie y perfiles de expresión génica dentro o alrededor del tumor. La presencia, ubicación o grado de organización funcional de las poblaciones inmunes infiltrantes puede variar [2]. Esta heterogeneidad sugiere que las diferentes poblaciones pueden tener distintos roles en el control del crecimiento tumoral.

El estudio de estas características ha permitido la identificación de marcadores pronóstico de la respuesta clínica de los pacientes al tratamiento, los cuales permiten diferentes aproximaciones para clasificar las neoplasias [2]. Clásicamente, los tumores se han estadificado utilizando el sistema TNM, pero en los últimos años, la validación de modelos como el de *Immunoscore* ha permitido evaluar de manera más refinada el pronóstico de los pacientes con cáncer colorrectal, convirtiéndose en el sistema líder para establecer el desenlace clínico al evaluar la densidad de la infiltración de linfocitos T (LT) CD3+CD8+ dentro del tumor y en el margen invasivo de este [3, 4].

En el cáncer de mama también se ha evaluado la importancia de la infiltración inmune como un factor pronóstico de la respuesta clínica a la quimioterapia neoadyuvante (NAC) [5, 6]. Puntualmente, en estos tumores se ha demostrado que en células no tumorales la expresión de ciertos genes involucrados con proliferación como la topoisomerasa IIα, el CDC2 y el antígeno proliferativo nuclear se correlacionan con una baja tasa de metástasis [7]. Adicionalmente, otros trabajos evidenciaron que la expresión de genes de citoquinas como IL-12, IFNγ, e IL-2 se correlaciona con un pronóstico favorable, mientras que la expresión de genes de citoquinas como IL-4, IL-13 y el TGFβ [8] o un mayor número de Tregs son de mal pronóstico [9].

La quimioterapia tradicionalmente se ha descrito como un tratamiento inmunosupresor, sin embargo, múltiples estudios han demostrado que esta puede activar el sistema inmune al inducir muerte celular inmunogénica (MCI) en las células tumorales, promoviendo la liberación de patrones moleculares asociados a daños (DAMPs por sus siglas en inglés) [10-15]. Según Sistigu *et al.*, la producción de IFNs de tipo I por células tumorales inducida por antraciclinas aumenta la

expresión del MHC-I en estas células [16] y células del estroma [17], contribuyendo al reconocimiento del tumor y a la activación y maduración de células presentadoras de antígeno (APC por sus siglas en inglés), y en última instancia mejorando la respuesta de los LT a los tumores. Este fenómeno ha sido descrito también después del tratamiento con los agentes quimioterapéuticos como Doxorrubicina, Ciclofosfamida, Oxaliplatino o Gemcitabina [10, 12, 13, 18-20].

Previamente en el laboratorio de Inmunología y Medicina Traslacional dos tesis doctorales con diferentes enfoques evaluaron el cambio de poblaciones del sistema inmune en sangre periférica en respuesta a la NAC por medio del inmunomonitoreo por citometría de flujo multicolor, encontrando un aumento en la maduración de células dendríticas y una disminución en la expresión de marcadores de agotamiento y de senescencia en LT [21, 22]. Continuando con la línea de trabajo de estas tesis y del grupo de Inmunología y Medicina Traslacional, el propósito de esta tesis de maestría es evaluar el efecto de la NAC en las poblaciones inmunes infiltrantes de tumores de cáncer de mama por medio de la técnica de inmunohistoquímica secuencial sobre lámina única (ISSLU) para evaluar el infiltrado inmune *in-situ* [23, 24] y por medio de técnicas de análisis del transcriptoma tumoral [25, 26].

2. Planteamiento del problema y justificación.

Según la Organización Mundial de la Salud, el cáncer de mama es el más frecuente en la mujer, para el 2020 en Colombia representaba el 25.7% de todos los tumores diagnosticados en las mujeres y el 8% de la mortalidad total por cáncer [27]. Su incidencia y prevalencia han aumentado a pesar de campañas de prevención y detección temprana, como la práctica mensual del autoexamen y la realización de la mamografía bianual en mujeres mayores de 50 años. La mayoría de los casos continúan diagnosticándose en estadios tardíos, lo cual ensombrece el pronóstico de este tumor. Su diagnóstico en mujeres cada vez más jóvenes y sin factores de riesgo asociados, hacen del cáncer de mama un problema de salud pública en nuestro país [28].

La inmunovigilancia de los tumores es de suma importancia para el control del cáncer. Los Linfocitos T CD8+ (LT-CD8+) y las células Natural Killer (NKs) son las encargadas de inducir la muerte en las células tumorales, al igual que otros componentes inmunes, como los Macrófagos (Mϕ)y células dendríticas (DCs), encargados de fagocitar y presentar antígenos, y los Linfocitos T CD4+ (LT-CD4+), responsables de orquestar la respuesta inmune adaptativa, los cuales también juegan un rol destacado en la prevención del desarrollo del cáncer [29]. Por otra parte, estudios han demostrado que el sistema inmune también puede jugar un papel protumoral, ayudando en la oncogenia y la progresión tumoral. La infiltración de tumores por células como los Linfocitos T Reguladores (Tregs) y las Células Mieloides Supresoras (MDSCs) promueven un TME inmunosupresor propicio para disminuir la capacidad de los LT efectores de remover o destruir las células tumorales, y que el tumor progrese [29, 30]. La deficiente inmunovigilancia de algunos tumores también ha sido atribuida a la expresión de marcadores de agotamiento inmune, como PD-1, PD-L1 y CTLA-4 en Linfocitos T, los cuales pueden perder la capacidad de secretar citoquinas, activarse y adquirir funciones efectoras en respuesta al antígeno [31].

En cáncer colorrectal, el consorcio *Immunoscore*, ha validado la infiltración inmune como un factor pronóstico del riesgo de recurrencia del tumor (pacientes con un mayor *Immunoscore* tienen menor riesgo de recurrencia de la enfermedad) y ha propuesto la infiltración inmune como un factor adicional en el sistema de clasificación TNM [3]. La aplicación del *Immunoscore* a otros tipos de tumores, especialmente al cáncer de mama, no se ha logrado de manera satisfactoria, a pesar de resultados muy bien sustentados que sugieren que la infiltración por células CD3+

CD8+ es un marcador sugestivo de desenlace clínico favorable en respuesta a la quimioterapia neoadyuvante [32, 33], y que la infiltración por células T foliculares, productoras de CXCL13 es marcador de buen pronóstico en pacientes con cáncer de mama [34].

El esquema de quimioterapia con Antraciclinas/Ciclofosfamida (Esquema A/C), seguida de Taxanos, es utilizado ampliamente en terapia neoadyuvante en pacientes con cáncer de mama. Si bien, se le ha atribuido a la quimioterapia un papel supresor de la respuesta inmune, estudios en ratones sugieren que la Doxorrubicina induce MCI en el tumor, que facilita la liberación de señales de peligro y la presentación cruzada de antígenos tumorales por DCs necesaria para la inmunidad antitumoral mediada por LT CD8+ [35] y que la Ciclofosfamida utilizada a bajas dosis inhibe selectivamente Tregs y mejora la función de LT y NKs [36]. Teniendo esto en cuenta, encontramos necesario evaluar en humanos los hallazgos de modelos murinos para determinar si realmente el esquema con A/C está estimulando la respuesta inmune en contra del tumor en mujeres con cáncer de mama.

Por lo anterior en este trabajo de maestría se propone la implementación de la metodología de inmunomonitoreo *in-situ* utilizando la técnica de ISSLU para evaluar la presencia y distribución de leucocitos totales (CD45+) y algunas subpoblaciones como: como macrófagos (CD68+), Linfocitos B (CD20+), linfocitos T (CD3+), linfocitos T citotóxicos (CD8+), en relación a las células tumorales evaluadas por el marcador Pankeratinas; antes y después de la NAC en un grupo de pacientes con cáncer de mama. Adicionalmente, evaluar la infiltración de 22 subpoblaciones inmunes por medio del estudio del transcriptoma tumoral después de un ciclo de NAC y al finalizar el tratamiento. También se realizó una revisión sistemática para hacer una síntesis de la evidencia publicada hasta el momento por medio de tablas de tendencias y meta-análisis. Por último, se trató de determinar posibles correlaciones entre la presencia, localización, y agrupación de las poblaciones inmunes con la respuesta de las pacientes al tratamiento antitumoral.

3. Marco teórico

3.1 Cáncer de mama

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea, con diferentes subtipos moleculares, en la última edición del Cancer Staging Manual del consorcio AJCC, en el capítulo de cáncer de seno se definen además de las variables anatómicas clásicas TNM (T: tumor, N: nódulos regionales, M: metástasis distantes), variables genéticas como la expresión de los receptores de progesterona (PR), estrógenos (ER), del factor de crecimiento epidermal humano (HER2) y la expresión de marcadores de proliferación como Ki-67. En esta misma edición, se define el cáncer de mama como un conjunto de enfermedades con características moleculares diferentes (evaluadas con inmunohistoquímica, proteómica, perfiles de expresión y secuenciación de nueva generación), que se originan en el tejido mamario epitelial, aunque tienen diferentes pronósticos, diferentes sensibilidades a los tratamientos y diferentes patrones de recurrencia y diseminación [37]. Los tumores de seno también se pueden clasificar de acuerdo al sitio afectado en dos clases: tumores de mama invasivos y tumores de mama no invasivos. Los no invasivos son aquellos que no se han diseminado del sitio donde comenzaron, por ejemplo, los carcinomas ductales o lobulares *in-situ*. Los tumores invasivos son aquellos que se diseminan por fuera del lugar, y en los cuales las células tumorales pueden migrar no solo a otras partes de la mama, sino también a otros tejidos del cuerpo como al pulmón, los huesos, el hígado o el cerebro [38].

3.2 Inmunovigilancia y teoría de las 3 “E”

El rol que desempeña el sistema inmune en combatir los tumores ha sido ampliamente discutido, los primeros en proponer la idea de la *inmunovigilancia* fueron Burnet y Thomas en 1957, donde hablan de *mecanismos de control* en el desarrollo y la evolución del cáncer, mencionando que estos mecanismos varían entre células, pero pueden clasificarse en tres: i) el control hormonal del crecimiento y la actividad celular, ii) las interacciones entre superficies celulares como presiones mecánicas, y iii) el control *Inmunológico* asociado a la expresión de “marcadores propios” en el cuerpo [39]. Hasta ese momento, no había evidencia clara para confirmar la inmunovigilancia de los tumores, pero hoy en día, el papel de las poblaciones inmunológicas en el control de los tumores es claro, y se ha demostrado que el sistema inmune no solo puede prevenir el crecimiento tumoral, sino también moldearlo y promoverlo, proceso al que se le ha

llamado *inmunoedición del cáncer* detallado en la teoría de las 3 "E"-Eliminación, Equilibrio y Escape"- (Figura 1). El concepto de inmunoedición fue propuesto y confirmado por Schreiber y colaboradores en múltiples trabajos, tomaron como modelo el sarcoma inducido por metilcolantreno y demostraron que tumores derivados en ratones inmunocomprometidos (RAG-2$^{-/-}$) son más inmunogénicos que los tumores derivados en ratones inmunocompetentes, pues no han sido editados por LT ni por NKs [40].

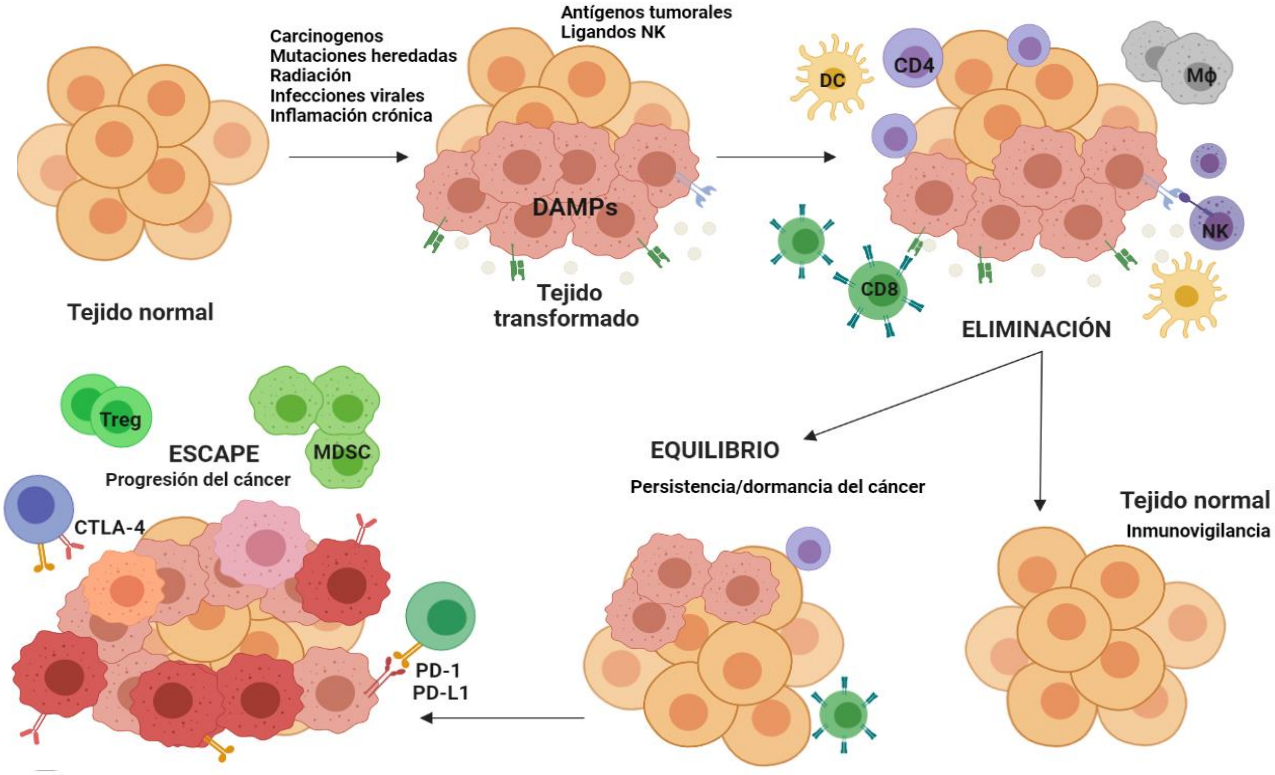

Figura 1. ***Proceso de Inmunoedición y Teoría de las 3 "E".*** Las células transformadas son reconocidas y eliminadas por el sistema inmune, pero quedan en estado latente aquellas que no expresaban estás moléculas, evitando ser reconocidas y eliminadas por el sistema inmune. Finalmente, estás células latentes escapan de la presión inmune y proliferan, generando un microambiente inmunosupresor. Tomada y modificada de Schreiber, *et al*., (2011). Imagen realizada con el software libre Biorender.

Fase I Eliminación: El principio central de la inmunoedición es que el reconocimiento de antígenos tumorales por LT, entre otras poblaciones inmunes, conlleva a la eliminación de las células transformadas (Figura 1). Como evidencia de que el sistema inmune puede evitar el crecimiento tumoral, se ha demostrado que ratones inmunodeficientes desarrollan más tumores que ratones inmunocompetentes. En la fase de eliminación, el primer paso es la generación de

señales de alarma que inducen la activación de la respuesta inmune innata y adaptativa, como las moléculas de peligro tipo calreticulina o HMGB-1 (Figura 1), ambas proteínas intracelulares que en momentos de estrés se expresan en la membrana o se secretan al medio extracelular, activando células presentadoras de antígeno del sistema inmune innato, como DCs y Mφ, que se encargan de activar células efectoras como LT-CD8+ y NKs [41]. Los protagonistas de la eliminación de las células transformadas terminan siendo los LT-CD8+ que reconocen antígenos tumorales presentados en el complejo mayor de histocompatibilidad tipo I y las células NK que reconocen la pérdida de este en la superficie celular (teoría de la pérdida de lo propio); estos tipos celulares secretan moléculas efectoras como los Interferones (IFN) tipo I (IFNα/β) y tipo II (IFNγ), necesarios para la activación de la respuesta inmune antitumoral, y median la muerte de células tumorales por medio de moléculas citotóxicas como la perforina, TRAIL, y los receptores Fas/FasL [42].

Fase II Equilibrio: la teoría de las 3 “E” afirma que después de la eliminación de la mayoría de las células tumorales, sobreviven algunas en estado latente, las células que expresaban moléculas de peligro y antígenos tumorales fueron eliminadas y quedan células que ya no las expresan, o expresan otros tipo de moléculas de complejo mayor de histocompatibilidad no clásicas como HLA-G (para no activar a las células NK), con lo que el tumor se vuelve menos inmunogénico, y las células tumorales evolucionan para resistir el reconocimiento inmune e inducir inmunosupresión (expresando ligandos de receptores inhibitorios tipo PD-L1). La fase de equilibrio es un balance entre la actividad antitumoral y la secreción de citoquinas protumorales como la IL-10 y TGF-β [42].

Fase III Escape: durante esta fase, el sistema inmune ya no puede contener el crecimiento tumoral, las células tumorales evaden el reconocimiento inmune, pues ya no expresan MHC-I con antígenos tumorales, ni moléculas de peligro que activen la respuesta. Por el contrario, el ambiente se torna inmunosupresor, con la secreción de citoquinas como la IL-10, el TGF-β y factores angiogénicos como el VEGF y el M-CSF. Igualmente aumenta la expresión y secreción de moléculas tipo IDO, TDO, PD-L1, PD-L2, galectina 1/3/9, CD39 y CD73. En estas condiciones incluso se reclutan poblaciones de células inmunes que ayudan al progreso tumoral Tregs, las MDSCs y los Mϕ asociados al tumor (TAMs). Este TME termina generando un fenotipo de agotamiento en las poblaciones efectoras que antes eliminaron al tumor, el cual es reconocido por la expresión de moléculas como PD-1, CTLA-4, Tim-3, y LAG-3 [42].

3.3 Infiltrado inmune tumoral.

Una característica fundamental del infiltrado inmune es que parece ser muy heterogéneo entre los tipos de tumores y entre las subclasificaciones de tumores que varían de paciente a paciente. Todas las poblaciones de células inmunes se pueden encontrar o no en el tumor, igualmente varía la ubicación (en el centro de las células tumorales o al margen) y la organización en estructuras linfoides terciarias adyacentes, el hecho de que la localización varíe sugiere que las diferentes poblaciones pueden tener diferentes roles en el control del crecimiento tumoral. El estudio de la presencia, localización y organización funcional de las poblaciones inmunes dentro del tumor ha posibilitado la identificación de marcadores beneficiosos o deletéreos para la respuesta clínica de los pacientes [2].

Del estudio de la interacción entre el sistema inmune y el tumor, se derivan diferentes posibilidades no solo para tratar el cáncer, sino también para clasificarlo. El estudio del infiltrado permite definir variables inmunes como marcadores útiles para diferenciar grupos de pacientes según su desenlace clínico y así desarrollar diferentes aproximaciones para estratificar pacientes y sus tumores.

Como ya había sido validado por el consorcio *Immunoscore* la presencia y alta densidad de Linfocitos Infiltrantes de Tumor (TILs por sus siglas en inglés) se correlacionan positivamente con un aumento en la sobrevida de pacientes con cáncer colorrectal, pero en el trabajo publicado por Halama y colaboradores, (2011) demostró que en lesiones metastásicas de hígado de pacientes con cáncer colorrectal hay asociación entre los perfiles inmunes y la respuesta de estos a la quimioterapia. En este trabajo se evalúo la infiltración de LT CD3+ CD8+ Granzima B+ y se definieron valores para clasificar a los pacientes con puntajes de infiltración [0-4] donde a mayores puntajes, mejor respuesta a la quimioterapia [43]. Otros investigadores se han planteado validar algunas variables inmunológicas como posibles factores pronóstico de la sobrevida de pacientes con otros tipos de tumor, dentro de estos trabajos se enmarca el trabajo de Dieu-Nosjean y colaboradores (2008) en el cual demuestran que estructuras linfoides terciarias, que se forman en los pulmones de pacientes con cáncer de células no pequeñas, se correlacionan positivamente con la respuesta clínica de los pacientes [44].

Para el cáncer de mama también se ha evaluado la importancia de la infiltración de leucocitos en los tumores, varios estudios han corroborado la importancia de evaluar los TILs como un factor

pronóstico de la respuesta clínica a la NAC [5, 6, 45]. En la mayoría estos estudios se utiliza la inmunohistoquímica para evaluar la presencia de los linfocitos y se correlaciona esta variable con la respuesta clínica al tratamiento. Es importante resaltar que en todos estos estudios, solo se evalúa la población de Linfocitos T, los cuales resultan ser de buen pronóstico para las pacientes con cáncer de mama, pero no tienen en cuenta otro tipo de marcadores de otras poblaciones celulares inmunes que pueden estar interviniendo en la inmunidad antitumoral.

Urueña, *et al*., (2021) publicaron un trabajo completo sobre la caracterización del infiltrado inmune en cáncer de mama, describiendo poblaciones infiltrantes del tumor evaluadas por inmunohistoquímica: TILs, CD3, CD4, CD8, CD20, CD68 y FoxP3, sin encontrar ninguna diferencia significativa antes y después del tratamiento con NAC. En otros trabajos reportan la disminución de Tregs (Foxp3+) [46-54]. Garcia-Martínez, *et al*., (2014) reporta además una diminución en respuesta a las NAC de poblaciones de LB y Mϕ-M2 [55]. Hornychova, *et al*., (2008) también reporta una disminución de los Mϕ-M2 y un aumento de NKs y DCs estromales[56].

3.4 Inmunosupresión en el microambiente tumoral

La respuesta inmune en el desarrollo del cáncer es dinámica, como ya se mencionó previamente la inmunovigilancia del tumor permite en muchas ocasiones su erradicación, sin embargo, el sistema inmune también facilita el crecimiento tumoral a través de la inflamación crónica, y la expresión de receptores inhibitorios [57]. Los LT son esenciales para montar una efectiva respuesta antitumoral, pero el TME impacta la función y el fenotipo de los LT, lo que puede conducir a células con características de anergia, agotamiento y/o senescencia [31]. Los LT anérgicos, son células con reducida expresión de moléculas co-estimuladoras y alta señalización co-inhibitoria, no responden a la activación y expresan limitada cantidad de IL-2. Los LT agotados, son células efectoras que han perdido su función y la expresión de citocinas, debido a la estimulación constante, y expresan varios receptores reguladores. Y las células T senescentes, son células terminalmente diferenciadas con disminución en la expresión de CD28 y TCR [31].

Cuando un LT entra en agotamiento, su estado transcripcional cambia y su función efectora se pierde, por ejemplo, los TILs no controlan eficientemente el crecimiento tumoral, pues han perdido su capacidad efectora por la presentación antigénica crónica en el TME [58, 59]. Dentro

de estas células se ha demostrado la pérdida de la actividad citotóxica, el potencial proliferativo, y la sobre expresión de Receptores Inhibitorios (RIs) como son PD-1, CTLA-4, LAG-3, TIM-3, y la baja secreción de citoquinas como IL-2, IFN-γ y TNF-α. Este fenotipo se ve acompañado de una baja tasa transcripcional de los receptores para IL-7 e IL-15 y de moléculas como Lck y NFATc, involucradas en la señalización del TCR [58-60]. El agotamiento celular resultado de la estimulación antigénica crónica y la deficiente co-estimulación generan LT con perfiles epigéneticos y transcripcionales alterados [31]

Cuando un LT empieza a expresar RI, su estado transcripcional cambia y su función efectora se pierde. Este fenotipo ha sido ampliamente demostrado en condiciones donde los antígenos son presentados de manera crónica sin la adecuada activación del LT, como ocurre típicamente en infecciones virales crónicas con Citomegalovirus o Epstein Barr, pero también en el microambiente tumoral [60]. Los RI son una familia muy heterogénea de moléculas que median la regulación negativa por diferentes mecanismos moleculares, desde el secuestro de ligandos de receptores co-estimuladores, la mediación de la muerte celular y la regulación al alta de genes inhibitorios por medio del uso de motivos ITIMS [61]. En pacientes con cáncer de mama se ha relacionado la expresión de PD-1 con la baja producción de IL-2, posiblemente generado por la defectuosa señalización a través del TCR y la molécula co-estimuladora CD28 [62]. Estos estudios sugieren que las células tumorales median este mecanismo por medio de la sobreexpresión de PD-L1, por lo cual se ha asociado la expresión de esta proteína en las células tumorales a un pobre pronóstico de la enfermedad.

Una adecuada respuesta de la inmunovigilancia sobre las células tumorales se refleja en la capacidad citotóxica de LT-$CD8^+$ y la capacidad colaboradora de LT-$CD4^+$, los cuales posterior a la presentación adecuada del antígeno, se deben diferenciar a partir de una población virgen a células efectoras que producen citoquinas como IFN-γ y TNF-α. Durante el proceso de diferenciación, deben pasar por un fenotipo de células de memoria capaces de responder de manera eficiente ante un nuevo reto antigénico. La activación temprana de LT es evidenciable por varios fenómenos conocidos como el aumento en la frecuencia del recambio del TCR (internalización del TCR) [63] y la expresión de moléculas como CD25, CD69 y CD40L [64].

En primer lugar, el proceso de recambio del TCR regula el proceso de activación de las células T, este proceso de reciclaje incluye a la mayoría de los elementos que hacen parte del complejo

TCR/CD3/Cadena ζ, evitando nuevas interacciones del TCR con el complejo MHC/péptido en la APC. Por otro lado, el CD25 es la cadena α del receptor de IL-2 que al ser estimulado facilita la proliferación y diferenciación de las células estimuladas mediante diferentes vías de señalización (STAT5, SOS/ERK y PI3K/AKT). Finalmente, la expresión deCD40L es fundamental para la activación de CD40 en las APC con el fin de inducir la producción de IL-12 necesaria para la síntesis de IFN-γ por parte de los LT [64]. En pacientes con cáncer de mama, la tasa de recambio del TCR y de las moleculas asociadas es muy baja, al igual que la expresión de CD40L en respuesta a estimulos anti-CD3/CD28/CD2. En el compartimiento de APC las DCs secretan muy baja cantidad de IL-12 y tienen una muy baja expresión de CD83 en respuesta a citoquinas pro-inflamatorias.

3.5. Importancia del estudio de la composición inmune del microambiente tumoral.

El microambiente inmune tumoral (TIME) se ha descrito como un actor determinante en el pronóstico de los pacientes con cáncer, pues algunas poblaciones inmunes, como los linfocitos T CD8+ efectores y de memoria, mejoran la respuesta clínica a los tratamientos antitumorales, mientras otras poblaciones como los Tregs y las células mieloides supresoras (MDSCs) contribuyen a la progresión tumoral. Puntualmente, en los tumores de cáncer de mama se ha demostrado que la expresión en células NO tumorales de ciertos genes de vías proliferativas como la topoisomerasa IIα, el CDC2 y el antígeno proliferativo nuclear se correlacionan con una baja tasa de metástasis [65]. Adicionalmente, otros trabajos definieron que un fenotipo con una población Th1 activada, y secreción de TGF-β regulada a la baja se correlaciona con un pronóstico favorable en pacientes con cáncer de mama [66], otros estudios han corroborado estos resultados, demostrando que hay una correlación positiva entre una mejor respuesta clínica y la expresión de genes distintivos de un fenotipo Th1 como IL-12, IFNγ, e IL2, mientras que si se evalúan genes de una respuesta Th2 como la IL-13 y el TGFB, estos suprimen la actividad antitumoral de las células Th1 [66].

Las poblaciones que clásicamente se han descrito como reguladoras, no parecen tener efecto beneficioso, sino más bien deletéreo para la respuesta antitumoral, pues promueven un microambiente antiinflamatorio y disminuyen la actividad de linfocitos efectores. Un estudio

demostró una correlación entre mayor número de Tregs y un estado avanzado de la enfermedad y un peor pronóstico en cáncer de mama [67].

3.6. Efecto de la quimioterapia neoadyuvante (NAC) en las células tumorales

La quimioterapia es un tratamiento inmunosupresor, aunque puede ayudar a la activación del sistema inmune porque induce muerte celular inmunogénica (MCI) en las células tumorales, las cuales emiten señales de peligro estimulando la respuesta inmune. La producción de Interferones de tipo I (IFNs-I) por células tumorales, inducida por Antraciclinas, ayudan al reconocimiento de estas células y a la activación de células presentadoras de antígeno y LT [16]. De esta manera, los medicamentos como Cisplatino, Etopósido, Paclitaxel, Topotecán y Vinblastina también estimulan a las células tumorales para producir IFNs-I que favorecen la maduración de las DCs, y en última instancia, mejoran las respuestas de LT contra los tumores. Los IFNs-I estimulan la expresión del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC por sus siglas en inglés) clase I por las células tumorales [16] y las células del estroma [17] lo que permite su reconocimiento por LT citotóxicos. Vale la pena mencionar, que la expresión de las moléculas de MHC-I también puede ser estimulada en el tumor después del tratamiento con los agentes quimioterapéuticos como Ciclofosfamida, Oxaliplatino o Gemcitabina [10] que mejoran la inmunogenicidad de las células tumorales, y por lo tanto, su control eficiente por LT. Por otro lado, se ha demostrado que la radiación gamma aumenta la expresión de antígenos tumorales [18] pues genera estrés del Retículo Endoplasmático (ER) y con esto, la presentación de péptidos abortivos en moléculas del MHC-I [68].

Con la quimioterapia y la radioterapia se intenta producir toxicidad directa sobre el tumor donde el fármaco genera MCI y un microambiente inflamatorio que atrae APCs, las cuales fagocitan las células tumorales muertas y presentan antígenos una vez migren a nódulos linfáticos al encuentro con LT. Para que las células tumorales sean fagocitadas, es necesario que las células mueran por apoptosis y no por necrosis [11], la muerte por apoptosis de células tumorales ha sido demostrada en el tratamiento con antraciclinas [12-14]. Algunos estudios han demostrado que el tratamiento con Doxorrubicina incrementa la inmunogenicidad de células tumorales, lo que ayuda a que estas confieran inmunidad citotóxica especifica [12-14, 19, 69-71].

Algunas características de la MCI es la traslocación de moléculas intracelulares a la membrana plasmática, como la Calreticulina (CRT, chaperona del RE asociada a la homeostasis del Ca^{+2} y a la presentación de péptidos en el MHC) y la fosfatidilserina, la cual en una célula viable se encuentra hacia el lado intracelular de la membrana plasmática. Estas actúan como una señal para las DCs, que facilitan la fagocitosis y aumentan el procesamiento y la presentación de antígenos tumorales a los LT [72-75]. En experimentos con células de cáncer de colon murino y fibrosarcoma tratadas con antraciclinas o radiación ionizante se encontró traslocación del 5-10% del contenido de CRT desde el ER hacia la superficie celular [75]. La traslocación de CRT estuvo acompañada de la expresión de ERp57 formando un complejo proteico en la superficie como indicador de estrés de ER; este proceso de traslocación no ocurrió en muerte celular no inmunogénica como la necrosis [76, 77].

3.7. Microambiente inmune Tumoral en Cáncer de Mama en Respuesta a la NAC

Los estudios de poblaciones celulares y su distribución dentro del estroma tumoral en cáncer de mama muestran un microambiente tumoral altamente supresor se caracteriza por un alto número de: (i) células T Reguladoras (Tregs: CD4+, $CD25^{high}$, $CD127^{low}$ y FoxP3 +); (ii) macrófagos o células granulocíticas mal diferenciadas ($Lin\text{-}1^{Low}$, $HLA\text{-}DR^{Low}$, $CD33^{High}$ y $CD11b^{High}$ (MDSCs); (iii) Células dendríticas (DCs) tolerogénicas que expresan PD-L2, baja expresión de CD80, CD83 y CD86 (requerido para la co-estimulación de células T) y producción deficiente de IL-12 (una citoquina clave para la actividad antitumoral de LT y células NK)

La frecuencia de células Tregs que infiltran los tumores de pacientes con cáncer de mama podría predecir la respuesta al tratamiento con NAC y la probabilidad de estás pacientes de recaer a largo plazo. Antes del tratamiento se ha documentado que las Tregs son activadas por DCs tolerogénicas dentro de los infiltrados linfoides en la zona marginal, pero no en el lecho tumoral cerca de las células T CD3+ [78]. Las Tregs son reclutadas a las lesiones neoplásicas por la expresión de CCL22 y CCR4 en células tumorales, la cual se induce mediante la secreción de IFN-γ por NKs y la secreción de IL-1β y TNF-α por monocitos [79].

En particular, los cambios en la relación intratumoral LT-CD8+/Tregs durante la NAC recuperan la vigilancia del sistema inmune al tumor, el aumento en el número de LT-CD8+ después de un solo ciclo de NAC con antraciclinas predice la respuesta clínica del tumor a todo el régimen

quimioterapéutico (seis ciclos) [49, 80] y más recientemente, varios grupos de investigadores han demostrado la importancia de la relación LT-CD8+/Tregs para predecir respuestas del tratamiento a la NAC del cáncer de mama agresivo [81]. De forma similar, DeNardo y sus colegas demuestran que la infiltración de las lesiones primarias de cáncer de mama por células CD68l^{ow} (macrófagos y DCs plasmacitoides) se asocia positivamente con la supervivencia sin recaídas y que la NAC puede reprogramar el microambiente tumoral a uno que fomenta la inmunidad antitumoral [82]. Demaria et al. demostraron que la NAC basada en Paclitaxel en pacientes con cáncer de mama incrementa la frecuencia de TILs detectables por inmunohistoquímica en pacientes que respondieron a la quimioterapia [83]. Desde entonces, el valor pronóstico de los recuentos de linfocitos T CD8+ que infiltran el tumor en pacientes con cáncer de mama ha sido confirmado por Mahmoud [67] y por otros [84, 85]. La evidencia acumulada indica que la NAC estimula la infiltración de los tumores de cáncer de mama por las células linfoides y que expresan Granzima B al mismo tiempo que aumenta la proporción intratumoral de LT-CD8+ a Tregs [86]. Igualmente, se encontró que la infiltración de tumores de cáncer de mama por LT-CD4 foliculares (Tfh) productoras de CXCL13, es un predictor de supervivencia y de respuesta a la NAC. [34], [87]. Finalmente, en una cohorte de mujeres con cáncer de mama se demostró que la falta de expresión de marcadores de autofagia (LC3B) y muerte celular inmunogénica (HMGB1) tiene un mal pronóstico y una baja tasa de respuesta a la NAC.

En conjunto, estos resultados indican que las respuestas inmunitarias provocadas por la NAC son en gran parte responsables de la erradicación del tumor. Hasta ahora, para evaluar el impacto de la NAC en la inmunomodulación de DCs, LTs, MDSCs y Tregs, los estudios clásicos de IHC han sido fundamentales, sin embargo, estos métodos tienen una resolución limitada para descifrar la complejidad de las interacciones celulares. La buena noticia es que herramientas modernas, como la Inmunohistoquímica Multiparamétrica, tienen suficiente resolución para disgregar la compleja arquitectura histopatológica de las muestras tumorales y analizar la localización intratumoral precisa de diferentes poblaciones celulares dentro del tumor [88, 89] [90-93].

3.8. Inmunohistoquímica multiparamétrica secuencial sobre una sola lámina.

La inmunohistoquímica es una técnica enzimática que se basa en el reconocimiento antígeno anticuerpo para identificar moléculas (en su mayoría proteínas) presentes en tejidos que se han preservado con parafina. Esta técnica se ha vuelto de vital importancia en la clínica, y puntualmente en oncología, pues permite la clasificación de tumores según la expresión de marcadores. La importancia de esta técnica subyace en que no solo revela información de presencia del marcador de interés, sino que también permite describir la distribución de este en el tejido evaluado. Para los tumores de cáncer de mama las pruebas de inmunohistoquímica más comunes son para la evaluación de la expresión de los receptores de estrógenos, progestágenos y del oncogén HER2/neu, igualmente en algunas pacientes también se utiliza la marcación con Ki-67 para evaluar la capacidad proliferativa de las células tumorales. En el 2016, Remark y colaboradores [23] describieron una forma de realizar inmunohistoquímica secuencial sobre una misma lámina con hasta 10 marcadores distintos, con el fin de optimizar el análisis de lesiones cancerosas con alta resolución, a esta técnica la llaman “Inmunohistoquímica multiparamétrica secuencial sobre una sola lámina” (MICSSS por sus siglas en inglés). En esta técnica se utilizan secciones de tejido embebido en parafina de 3-5um, los cuales tiñen, escanean, y destiñen para caracterizar paneles de diferentes marcadores en una sola lámina, posteriormente, las imágenes son procesadas en un software de paisajismo lo que permite mapear y analizar la complejidad del microambiente tumoral.

3.9. Respuesta al tratamiento antitumoral con quimioterapia neoadyuvante (NAC)

La quimioterapia neoadyuvante es la primera línea de tratamiento para las mujeres con cáncer de mama con enfermedad local avanzada. Los regímenes de quimioterapia neoadyuvante se componen tradicionalmente de una antraciclina (Doxorrubicina) en combinación o administrada secuencialmente con taxanos (Paclitaxel o Docetaxel). Los regímenes basados en antraciclinas también suelen incluir Ciclofosfamida [94]. En pacientes con tumores grandes la quimioterapia logra reducir el tamaño tumoral la mayoría de las veces, mejorando la sobrevida de las pacientes, a la vez que aumenta las posibilidades en un 50% de tener cirugías conservadoras, en lugar de mastectomías radicales [95].

En los tumores de mama se debe hacer marcación pre-quimioterapia, para que en el momento de la cirugía sea claro donde estaba el tumor, pues en la mayoría de las pacientes la regresión tumoral es clara y en muchos casos el tumor puede incluso desaparecer por completo; adicionalmente, aquellas pacientes con tumores que no logran responder a la quimioterapia, usualmente van directo a cirugía para evitar la toxicidad con un tratamiento que no da respuesta clínica y suelen tener peor pronóstico que aquellas pacientes con tumores que si responden [94].

Ensayos clínicos que evalúan la quimioterapia neoadyuvante en subgrupos sugieren que el grado de tumor y la edad pueden identificar poblaciones de pacientes que tienen un mayor beneficio de la quimioterapia neoadyuvante [96]. Igualmente, estos estudios sugieren que la tasa de respuesta en pacientes con cáncer de mama triple negativo es mayor al resto de los subtipos moleculares. Sin embargo, el resto de subtipos moleculares tienen mayores alternativas terapéuticas cuando hay resistencia a la quimioterapia, como son la hormonoterapia (Tamoxifeno), y la terapia dirigida contra HER2 (Trastuzumab) [96]. Es importante seguir buscando marcadores que permitan mejorar la respuesta de los tumores de cáncer de mama a quimioterapia y demás tratamientos adyuvantes.

4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

i) ¿Cuál es la contextura y la distribución de los leucocitos que están infiltrando los tumores de cáncer de mama?

ii) ¿Está la quimioterapia con el esquema A/C estimulando la infiltración del tumor por células inmunes?

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

- Monitorear la contextura inmunológica del tumor antes y después de la quimioterapia en un grupo de pacientes con cáncer de mama.

5.2. Objetivos específicos:

1. Estandarizar el proceso de inmunohistoquímica secuencial para la marcación de biopsias tumorales.
2. Monitorear la presencia, localización y organización de las poblaciones inmunes infiltrantes de tumor antes y después de la quimioterapia.
3. Identificar si existen correlaciones entre la presencia de las poblaciones inmunes infiltrantes de tumor y la respuesta clínica de las pacientes al tratamiento.

6. METODOLOGÍA

Para cumplir con los objetivos propuestos en este trabajo de investigación, se realizaron cinco actividades. La primera correspondió al primer objetivo específico *Estandarizar el proceso de inmunohistoquímica secuencial para la marcación biopsias tumorales*. Esta actividad se realizó utilizando láminas de amígdala, órganos linfoides secundarios en los cuales se encuentran las poblaciones inmunes a evaluar: CD45, CD68, CD20, CD3, CD8 y Pankeratinas (marcación de células de origen epitelial) (Figura 2).

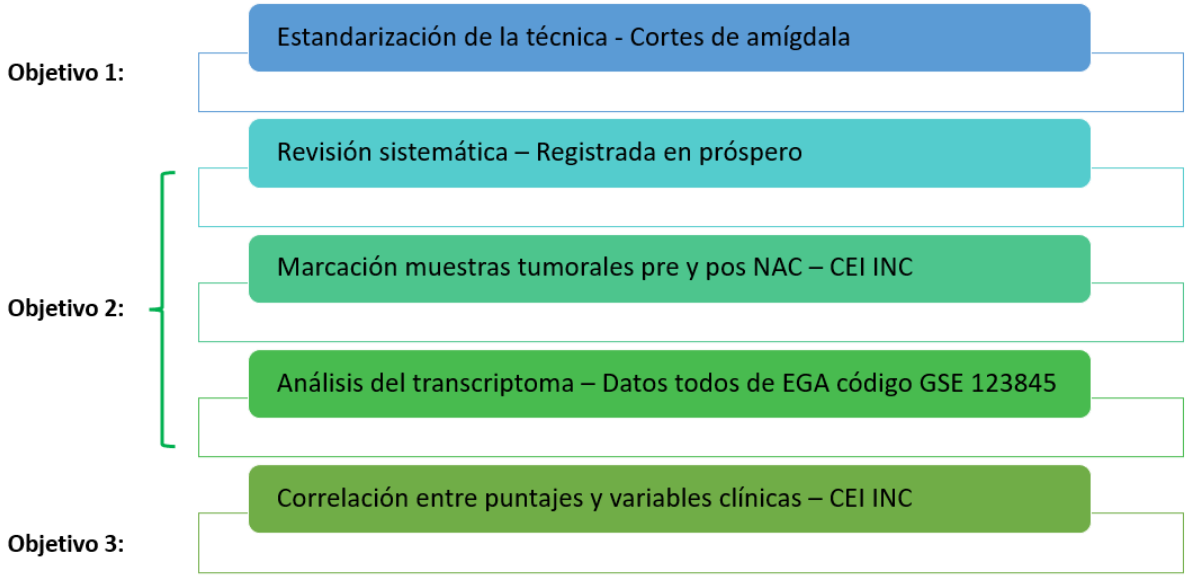

Figura 2. ***Esquema metodológico***. Actividades realizadas para responder a los tres objetivos específicos.

Para responder al segundo objetivo específico *Monitorear la presencia, localización y organización de las poblaciones inmunes infiltrantes de tumor antes y después de la quimioterapia*, realizamos tres aproximaciones metodológicas. La primera, una revisión sistemática para sintetizar la evidencia previamente publicada. La segunda, un estudio descriptivo con muestras de pacientes con tumores de mama, el cual fue aprobado por el comité de ética del Instituto Nacional de Cancerología, y realizado entre esta entidad y la Universidad Nacional de Colombia. La tercera actividad correspondió al análisis de datos de transcriptoma libres tomados del artículo Hee Park, *et al.,* 2020 [97], los cuales reposan en el European Genome

- Phenome Archive EGA – bajo el código acceso GSE123845. Es importante mencionar que estos datos corresponden únicamente al transcriptoma del tumor en diferentes momentos antes y después del tratamiento y no se accedió a datos personales ni confidenciales de las pacientes (Figura 2).

Por último, y con la intención de responder al objetivo tres *Identificar si existen correlaciones entre la presencia de las poblaciones inmunes infiltrantes de tumor y la respuesta clínica de las pacientes al tratamiento* se realizó una tabla de datos con las variables de desenlace clínico de las pacientes y los puntajes de las marcaciones de inmunohistoquímica antes y después de la NAC (Figura 2). Con esta tabla realizamos análisis de componentes principales, con el programa estadístico SPSS el cual reduce el número de variables que describen la varianza de las muestras y nos permite evaluar correlaciones entre la respuesta clínica de las pacientes y el cambio del infiltrado inmune [98]

6.1. Estandarización de la técnica de Inmunohistoquímica secuencial sobre lámina única (ISSLU) en cortes de amígdala

Para la estandarización de la técnica de inmunohistoquímica secuencial, se siguieron los protocolos publicados en [23, 24] en cortes de amígdala, pues al ser un tejido linfoide terciario, se utiliza como un tejido control para evaluar las poblaciones descritas en la Tabla 1. Con este protocolo también se marcaron las muestras de biopsias y especímenes quirúrgicos de cáncer de mama, actividad que responde al objetivo 2.

Marcación primaria

El primer paso para desparafinar las láminas de tejido fue incubarlas en el baño serológico a 60°C dos horas, y posteriormente pasarlas por Xileno (10 minutos, dos veces). Para rehidratar el tejido, se pasaron las láminas por concentraciones decrecientes de etanol: etanol al 96% (10 minutos), etanol al 70% (10 minutos), etanol al 50% (10 minutos), y agua MilliQ (5 minutos). Las láminas se incubaron en buffer de recuperación antigénica de EDTA a pH9 (ref. S236884-Dako) usando calor húmedo en el baño serológico a 90°C por 30 minutos. Y se recibieron en wash buffer 1X, de aquí en adelante todos los lavados se hicieron con este buffer (ref. S300685-Dako).

Se bloqueó la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3% en metanol. Se lavaron las láminas y se rodeó el tejido con una barrera hidrofóbica con el DakoPen (ref. S200230-Dako). Se bloquearon los sitios de unión inespecífica de proteínas con solución bloqueadora libre de suero (ref. X090930-Dako) y se colocaron las láminas en una caja con fondo falso y agua en el fondo para hacer un ambiente húmedo. Se agregó el anticuerpo primario (Ver tabla 1) y se dejó incubando una hora. Cuando se debía diluir el anticuerpo, se utilizó el diluyente de anticuerpos (ref. S080983-2-Dako). Se lavó el tejido y se agregó el anticuerpo secundario (ref. K406189-Dako), dejándolo incubar por 30 minutos.

Para el revelado, se utilizó el sustrato AEC (ref. SK-4200-Vector), pues este es soluble en etanol y se puede retirar para las marcaciones posteriores. Se preparó la solución del sustrato en agua milliQ de acuerdo al kit y se agregó a la lámina dejando incubar por 20 minutos. Se lavaron las láminas en agua milliQ y se contramarcaron con hematoxilina y agua amoniacal, para ver la morfología tisular. Por último, se lavó con agua y se colocó la laminilla con glicerina para proteger el tejido. Se tomaron las fotos en los *hotspots* de marcación. Para guardar las láminas para marcaciones posteriores se dejaron en la nevera a 4°C.

Anticuerpo	Referencia	Clon	Especie	Concentración	Población
CD68+	M087629	PG-M1	Ratón	1:50	Macrófagos
CD45+	IS75130	2B11+PD7/2	Ratón	RTU	Leucocitos
CD20+	IS60430	L26	Ratón	RTU	Linfocitos B
CD3+	A045229	Policlonal	Conejo	1:50	Linfocitos T
CD8+	M7103	C8/144B	Ratón	RTU	Linfocitos T- Citotóxicos
Pankeratinas	M3515	AE1/AE3	Ratón	RTU	Células tumorales
Secundario	K406189	Anti-Ratón Anti-Conejo	Cabra	RTU	NA

Tabla 1. ***Listado de anticuerpos utilizados***. Anticuerpos que se estandarizaron en láminas de amígdala y se utilizaron para evaluar el infiltrado tumoral en biopsias y especímenes quirúrgicos de cáncer de mama. Todos los anticuerpos son marca Dako y están estandarizados y validados para el diagnóstico clínico.

Marcaciones posteriores sobre la misma lámina

Para marcar con un nuevo anticuerpo la lámina, se realizó el desmontaje de la laminilla, incubando las láminas en agua MilliQ por 15 minutos a 60°C en baño serológico. Posteriormente se pasaron las láminas por etanol al 50% (5 minutos), etanol al 70% con 1% de HCl (5 minutos),

etanol al 96% (5 minutos), etanol al 70% (5 minutos), etanol al 50% (5 minutos) y agua MilliQ (5 minutos). Las láminas se incubaron en buffer de recuperación antigénica de EDTA a pH9 (ref. S236884-Dako) usando calor húmedo en el baño serológico a 90°C por 20 minutos.

Se recibieron en wash buffer 1X, se bloqueó le peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3% en metanol. Se lavaron las láminas y se rodeó el tejido con una barrera hidrofóbica con el DakoPen. Se bloquearon los sitios de unión inespecífica de proteínas solución bloqueadora libre de suero, y se adicionó un paso adicional de bloqueo de proteínas con PBS+SFB al 5%. De aquí en adelante se siguieron los mismos pasos de la marcación inicial.

6.2. Revisión sistemática

Se realizó una revisión sistemática siguiendo el método PRISMA para el reporte y diseño de ítems para revisiones sistemáticas y metaanálisis. Esta revisión se realizó con otros integrantes del grupo de Inmunología y Medicina Traslacional y fue sometida a la revista PloS. El protocolo del estudio se registró en PROSPERO (Identificación del protocolo: CRD42021243784 el 29/06/2021). Se buscó sistemáticamente las bases de datos Pubmed/MEDLINE, EMBASE, CENTRAL y BVS con una fecha de corte de 11 de junio del 2022. La estrategia de búsqueda (Anexo 1) incluyó términos MeSH y DeCS con los respectivos términos entrada. Se buscaron artículos en inglés y español, sin embargo, todos los artículos incluidos estaban en inglés. Se usaron filtros avanzados para eliminar revisiones y estudios en animales. Se incluyeron estudios en pacientes con cáncer de mama diagnosticado por evidencia patológica que solo recibieron quimioterapia neoadyuvante como primera línea de tratamiento. Se excluyeron los estudios en los que el cáncer de mama no era el tumor primario o los estudios con pacientes que recibían una terapia neoadyuvante diferente a la quimioterapia (terapia hormonal, inmunoterapia, etc.).

En caso de presentarse conflictos o desacuerdos sobre la elegibilidad de estudios, la decisión final se resolvió por consenso. Finalmente, 32 artículos cumplieron con todos los criterios de elegibilidad y fueron incluidos para la síntesis cualitativa. Las razones de exclusión de los artículos pueden ser consultadas en el Anexo 2. Para facilitar la extracción, manejo y almacenamiento de datos cualitativos y cuantitativos se crearon tablas de Excel.

En el estudio se tomó como base para la evaluación del riesgo de sesgo la herramienta de evaluación de calidad del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH) para estudios

antes y después (Pre-Post) sin grupo de control, a la cual se le realizó una modificación anexando a la misma otros criterios que incluyeron: i) Se describe claramente si el protocolo fue aprobado por un comité de ética, o si las pacientes firmaron un consentimiento informado, ii) Se describen los anticuerpos, clones y marcas comerciales utilizados para el establecimiento de los marcadores, iii) Se describen claramente los análisis del transcriptoma empleados en los artículos que este criterio aplique y iv) Se presentan los resultados de los estudios de forma clara.

Esta tabla de riesgo de sesgo modificada tuvo 3 instancias de revisión independientes: Primero fue evaluada por la persona responsable de la extracción de los datos. En segunda instancia fue evaluada por un supervisor y como última instancia contó con el aval de un revisor adicional. Cualquier discrepancia en la adjudicación de los puntajes de evaluación por los 3 revisores independientes se resolvió por consenso general.

Los datos extraídos corresponden al infiltrado inmune en tumores de cáncer de mama antes y después de la NAC. Cuando estaban disponibles, se extrajeron los datos demográficos y clínicos de los pacientes como la edad, las características de progresión tumoral y el esquema de quimioterapia neoadyuvante. Los efectos de las medidas corresponden a la respuesta patológica y datos de supervivencia de los pacientes. Para el manejo de los datos no reportados o faltantes, los autores de correspondencia y el autor principal fueron contactados electrónicamente, solicitando la información en crudo de los estudios. En el caso de no obtener respuesta en el lapso de dos semanas, los datos fueron extraídos usando el gestor gráfico Graph Grabber que permite la interpretación cuantitativa de las Figuras presentes en los artículos. Se separaron los resultados en los siguientes dominios: (i) marcadores celulares como: CD3, CD4, CD8, CD68, CD66b, CD163, CD20, FOXP3 CD56, CD83, CD1a y TILs. (ii) marcadores moleculares como: PD-1, PD-L1, CTLA4, LAG3, IL-1, IL-2, IL-4, IL-10, IL-17, IFN-y, TGF-B y OX40. Cuando estaban disponibles, los parámetros clínicos respecto a la progresión de la enfermedad y la respuesta patológica asociada al cambio en la infiltración pos-quimioterapia fueron extraídos.

Nueve artículos tenían los datos necesarios para realizar metaanálisis. Esta información se sintetizó en forest plots. Se realizó una descripción cualitativa de los trabajos restantes y se presentó de forma narrativa utilizando tablas.

Las medidas de efecto analizadas correspondieron a la media de los conteos del infiltrado celular junto con su respectiva desviación estándar. Estos parámetros fueron utilizados para el cálculo

de la media estandarizada (ME) y la diferencia de medias estandarizadas (DME) antes y después de la NAC. Se realizó el cálculo del estimador del efecto con un intervalo del 95% de confianza para cada comparación. La ponderación se realizó a través del método de varianza inversa. Los efectos se resumieron en el metaanálisis de efectos aleatorios. El tamaño del efecto y los intervalos de confianza se presentaron en forest plots. Se utilizó el software RevMan v.5.4 para la realización de metaanálisis.

6.3. Diseño del estudio Instituto Nacional de Cancerología

Este proyecto de investigación fue un estudio descriptivo experimental, que tuvo como objetivo realizar una comparación del TIME en pacientes con cáncer de mama antes y después del tratamiento de quimioterapia neoadyuvante con el esquema A/C. Por ser un estudio descriptivo, en el cual se plantea un seguimiento en la línea del tiempo a los cambios en el infiltrado inmune, no se intervinieron a las pacientes con tratamientos por fuera de los recomendados por su médico tratante. Este proyecto fue aprobado por el comité de ética e investigación del Instituto Nacional de Cancerología (INC) en el Acta No. 043 del año 2018.

Análisis de respuesta clínica: Los criterios más utilizados para la evaluación clínica de pacientes con cáncer son la reducción del tamaño tumoral y el seguimiento de la progresión de la enfermedad. Para este tipo de análisis se tuvo como guía el esquema de evaluación de la respuesta en tumores sólidos RECIST (*Response Evaluation Criteria In Solid Tumors*) [99]. Sin embargo, se utilizaron los elementos diagnósticos de cada paciente que estuvieran disponibles, más no se le solicitaron exámenes adicionales.

Recolección y procesamiento de datos: Se realizó una base de datos, con toda la información, tanto clínica (consignada en la historia clínica de las pacientes) como la información experimental. A partir de la base de datos se realizarán las consultas necesarias para generar las tablas y gráficas con los resultados para su posterior análisis estadístico.

La información que se almacenó fue la siguiente:

- Datos de identificación y socio-demográficos: Código de la participante, edad, estadificación del tumor, TNM, expresión de HER-2/neu, receptores de estrógeno y progestágenos, área

tumoral en mm^2 prequimioterapia y posquimioterapia (multiplicación de los dos diámetros mayores por ecografía de diagnóstico y seguimiento o medición por patólogo).

- Resultados de Inmunohistoquímica (antes y después de la quimioterapia): puntajes de marcación en las diferentes poblaciones de células inmunes, evaluación de la localización y agrupación de las poblaciones celulares.

Tamaño de la muestra: En este estudio se estableció un tamaño de muestra no probabilística por conveniencia de 5 pacientes en dos puntos de tiempo antes y después de la quimioterapia. Los análisis estadísticos fueron comparación de medias (datos pareados pre y posquimioterapia) a partir de los puntajes de dichos marcadores de cada uno de los tipos celulares. Se incluyeron 10 pacientes, sin embargo, solo se lograron tener datos pareados de cinco, las otras cinco pacientes tienen alguna de las dos muestras (pre o pos).

Hipótesis operativa: La quimioterapia neoadyuvante con el esquema A/C aumenta la infiltración de los tumores por poblaciones de células inmunes al inducir muerte celular inmunogénica en las células tumorales.

Procedimiento para la toma del consentimiento informado y de las muestras:

- Verificación y obtención de datos de contacto de pacientes que deseen participar en el estudio.
- Presentación del consentimiento informado y respuesta a cualquier duda al respecto.
- Obtención del consentimiento informado firmado tanto por el participante y dos testigos.
- Obtención de las muestras antes y después del tratamiento.

Grupo de estudio

Pacientes: Se incluirán mujeres mayores de edad con cáncer de mama de tipo ductal invasivo o lobulillar, que sean candidatas a quimioterapia primaria con esquema A/C (Doxorrubicina y Ciclofosfamida), sin otras enfermedades malignas concomitantes. Las pacientes serán invitadas a participar gracias a la colaboración del Instituto Nacional de Cancerología.

Criterios de inclusión

- Mujeres mayores de edad.

- Pacientes a quienes histológicamente se les haya confirmado carcinoma primario de mama de tipo ductal infiltrante o lobulillar.
- Pacientes que en el momento de su evaluación presenten un cáncer de mama con clasificación TNM: IIA, IIB, IIIA o IIIB; quienes como primera línea de manejo se les formule quimioterapia neoadyuvante con Doxorrubicina y Ciclofosfamida por un mínimo de 3 ciclos (esquema A/C).
- Índice de Karnofsky superior al 70% o ECOG 0 - 1
- Aceptación voluntaria del consentimiento informado.

Criterios de exclusión

- Pacientes que hayan recibido algún tipo de terapia como tratamiento a su patología tumoral (radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia o terapia génica).
- Pacientes con sarcomas mamarios, linfomas mamarios, sarcomas metaplásicos y coloides.
- Enfermedad autoinmune activa requiriendo tratamiento o historia de enfermedad autoinmune, que podría ser exacerbada por el tratamiento. Pueden incluirse pacientes con enfermedad endocrina controlada por terapia de reemplazo, incluyendo enfermedad tiroidea, enfermedad adrenal y vitíligo.
- Evidencia de una infección crónica o aguda, como VIH, hepatitis viral o tuberculosis, antes o después de la firma del consentimiento informado.
- Uso de inmunosupresores dentro de las 4 semanas anteriores al ensayo (p. ej. corticosteroides), como azatioprina, prednisona o ciclosporina A. Puede aceptarse el uso de esteroides locales (tópico, nasal o inhalado).
- Cardiomiopatía clínicamente significativa, la cual requiera tratamiento.
- Pacientes esplenectomizadas.
- Pacientes que no reciban el esquema de quimioterapia neoadyuvante con Doxorrubicina y Ciclofosfamida por tres ciclos.

Todas las participantes que aceptaron participar en el estudio firmaron un formato de consentimiento informado donde se le explicaba que su participación en el estudio incluye el acceso a la biopsia del tumor y al espécimen quirúrgico y recibieron una copia del mismo. Las muestras fueron identificadas por el código único asignado por el departamento de patología del

INC. El transporte de las muestras estuvo a cargo exclusivamente de la estudiante Manuela Llano León. El embalaje y transporte se realizó basados en la Norma Técnica Colombiana (NTC) 4702-6 de 1999 del ministerio de transporte. El transporte de las muestras se hizo a temperatura ambiente.

6.3.1. Procedimientos experimentales

Muestras de tejido: Se revisaron las láminas de hematoxilina & eosina del tejido correspondientes a cada bloque del tumor para evaluar la morfología del tejido, ver en cuales bloques quedaba tejido tumoral y escoger de cuales bloques sacar láminas para la marcación con inmunohistoquímica, con la ayuda de un residente en patología. Las láminas de amígdala fueron una generosa contribución de los docentes de patología de la facultad de Medicina. Los cortes se realizaron en el laboratorio de patología interfacultades gracias a la colaboración con el departamento de Patología de la Facultad de Medicina y fueron trasladadas al laboratorio de Inmunología y Medicina Traslacional para realizar la marcación con los anticuerpos descritos en la Tabla 1.

Semi-cuantificación de la marcación y descripción de la arquitectura del tejido: Para evaluar la marcación y semicuantificar el porcentaje de células positivas en las láminas de tejido tumoral, un observador revisó las láminas sin tener disponible la información clínica de los pacientes, se analizó cada lámina y se le otorgo un puntaje según la intensidad y la cantidad de células marcadas como se muestra en la Figura 2.

Igualmente se realizó una descripción de la localización y agrupación de las células en la lámina de tejido tumoral para evaluar no solo la presencia, si no la distribución en el tejido y la formación de estructura linfoides terciarias intratumoral. En todas las marcaciones de IHQ de muestras tumorales se incluyeron muestras pre y pos-quimioterapia, y una amígdala como control positivo de la marcación.

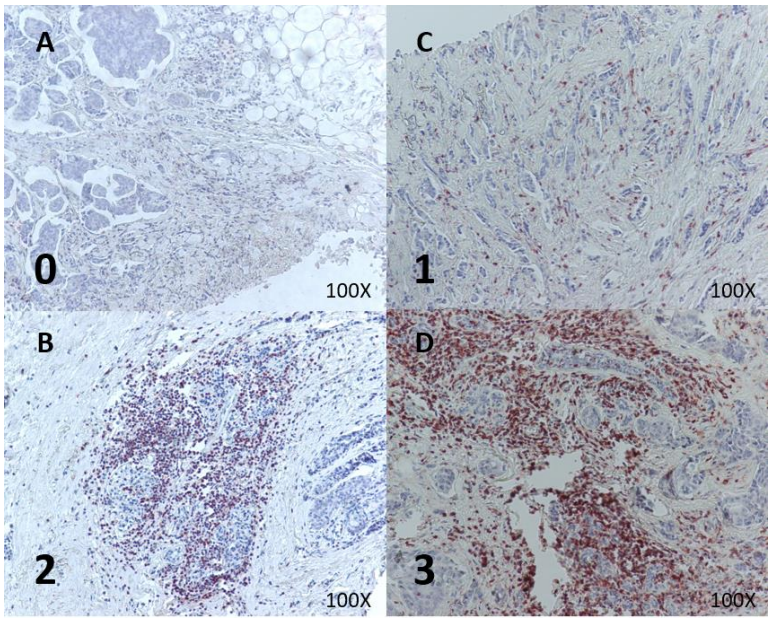

Figura 3. ***Ejemplos semi-cuantificación.*** Fotografías de referencia para puntear las biopsias y mastectomías de acuerdo al porcentaje de células positivas para cada marcación. A. Marcación negativa correspondiente a un puntaje de cero. B. Marcación con un 1 a 33% de células positivas correspondientes a un puntaje de 1. C. Marcación con un 33 a 66% de células positivas correspondientes a un puntaje de 2 y D. Marcación de más del 66% de las células correspondientes a un puntaje de 3.

6.3.2. Conducción del estudio

- Sitio de investigación: Todas las muestras fueron procesadas en el laboratorio de Inmunología y Medicina Traslacional ubicado dentro del Laboratorio de Equipos Comunes en la Facultad de Medicina y en el laboratorio de Patología Interfacultades ubicado en el edificio Manuel Ancizar, ambos en la Universidad Nacional de Colombia
- Manejo de sustancias y especímenes biológicos: Todas las muestras se procesaron según las normas de manejo de especímenes biológicos del Laboratorio de Equipos Comunes de la Universidad Nacional de Colombia.
- Archivo de datos y sistematización: Los datos obtenidos fueron procesados y archivados en computadores adjuntos al laboratorio de Inmunología y Medicina Traslacional, los datos personales de las pacientes participantes se consignaron en bases de datos confidenciales a las que únicamente los investigadores tuvieron acceso para fines pertinentes en el estudio.

- Consideraciones éticas: De acuerdo a la resolución N° 008430 de 1993 que establece las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en humanos, consideramos que el riesgo para las pacientes fue mínimo pues la toma de la muestra hace parte de los procedimientos clínicos de rutina para el tratamiento de su enfermedad, previo al acceso a las muestra la paciente deberá haber leído y firmado el consentimiento informado escrito según el artículo 14 de la misma resolución, y aprobado por el comité de ética del Instituto Nacional de Cancerología. Igualmente, se le habrán aclarado todas las dudas, y se le habrán explicado todos los riesgos que su participación en el estudio pueda generar.
- Consideraciones ambientales: Todos los procesos de laboratorio como la toma de muestras generan desechos ambientales de tipo biológico y químico por el empleo de los reactivos. Para disminuir el impacto ambiental generado por estos desechos, la disposición de estos se hará acorde con las guías del Laboratorio de Equipos comunes de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia.
- Confidencialidad: Una vez la paciente haya decidido participar en el estudio y haya firmado el consentimiento informado, sus datos personales serán consignados en bases de datos confidenciales a las que únicamente el investigador principal y los coinvestigadores tendrán acceso para fines pertinentes en el estudio

6.4. Análisis de transcriptoma con CIBERSORTx

En el 2015, Newman y colaboradores ensamblaron y publicaron la plataforma CIBERSORTx herramienta de uso libre de la universidad de Standford, con el objetivo de hacer *citometría in-silico*. Esta plataforma, permite la evaluación de 22 subtipos celulares inmunes, utilizando una matriz de firmas genéticas de referencia, con la cual se compara el transcriptoma tumoral (Figura 4) [26]. Con la intención de realizar una aproximación cuantitativa del cambio del infiltrado inmune en respuesta a la NAC, tomamos datos de transcriptoma tumoral antes, después de un ciclo y al finalizar la quimioterapia del European Genome-Phenome Archive EGA – bajo el código de acceso GSE123845, publicados por Hee-Park y colaboradores en el 2021 [97]. Estos datos se encontraban normalizados en TPM, por lo cual fueron subidos directamente a la plataforma de análisis de CIBERSORTx y corridos con 1000 permutaciones, utilizando la matriz LM22 como tabla de referencia de subtipos inmunes, los resultados de este análisis se pueden consultar en el anexo 3.

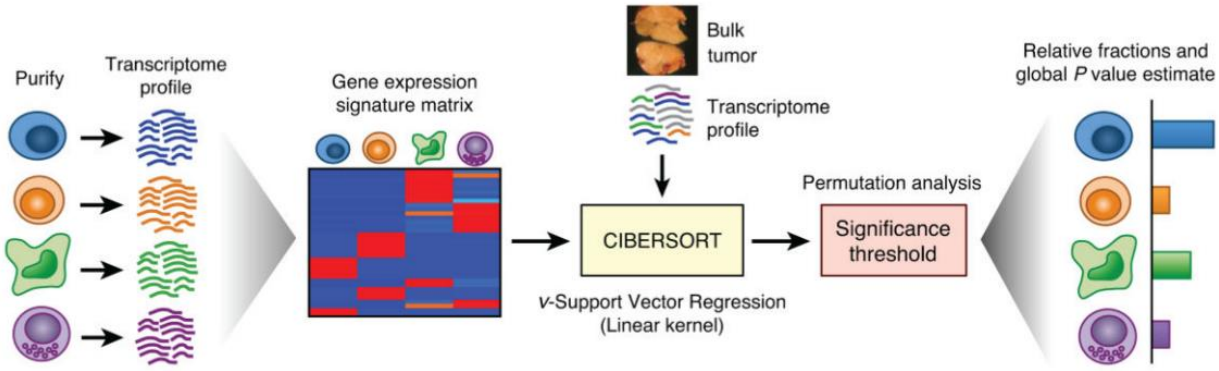

Figura 4. ***Diagrama metodológico CIBERSORTx***. La plataforma de CIBERSORTx utiliza una matriz de referencia con perfiles transcripcionales de 22 subtipos inmunes. Esta matriz fue realizada por los autores por medio de single cell RNA seq. Los datos del transcriptoma deben ser normalizados a TPM, y finalmente el programa los compara con la matriz de referencia para definir las fracciones relativas de cada población dentro del transcriptoma en estudio Tomada de [26].

6.5. Análisis de componentes principales

Con el fin de visualizar de manera más sencilla el comportamiento de las muestras, y reducir la complejidad de los análisis de múltiples variables, se requiere de pruebas estadísticas como el análisis por componentes principales (PCA) que hace parte del grupo de análisis conocido como análisis factorial. Como su nombre lo indica, busca obtener dentro de un grupo de datos con múltiples variables, factores dominantes que expliquen o describan de manera “resumida” (componentes) el comportamiento de las variables. Después de realizar el análisis, los componentes son registrados en un plano x y (componente 1 y 2 respectivamente) lo cual reduce el número de dimensiones facilitando el análisis de multivariado. En este caso, se buscó determinar el comportamiento de las variables del infiltrado inmune y de desenlace clínico en las pacientes antes y después de la quimioterapia. Generalmente estos factores se disponen de manera ortogonal entre ellos (planos perpendiculares entre cada dimensión evaluada), y se ordenan según la varianza de las variables que explican cada componente. Por lo anterior, algunos factores se mantienen para ser considerados y algunos pueden ser descartados, esto último en el caso de que no reflejan el comportamiento de los datos en los dos componentes. Una vez seleccionados los factores principales estos pueden ser rotados con el fin de facilitar su interpretación [100, 101].

6.6. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron en GraphPad Prism 5.0. El puntaje de cada marcador poblacional se registrará para cada paciente en dos puntos tiempo y se compararán utilizando las pruebas estadísticas no paramétricas: Wilcoxon para muestras pareadas, Mann -Whitney para análisis de grupos pre y pos-NAC y Kruskal Wallis para análisis de grupos en tres tiempos: pre, un ciclo y al finalizar la NAC. Igualmente, este estudio plantea evaluar si hay correlaciones entre la presencia o ausencia de algún marcador y la respuesta clínica de las pacientes a la quimioterapia para esto se utilizará el análisis de componentes principales en el software SPSS.

7. RESULTADOS

7.1. Capítulo 1. Estandarización de la técnica de inmunohistoquímica secuencial sobre lámina única

Marcación secuencial del mismo anticuerpo mantiene la antigenicidad.

Como primer objetivo de esta tesis de maestría, se planteó estandarizar la técnica de ISSLU. Esta técnica, publicada por Remark en el 2016, representa una alternativa costo-efectiva para los laboratorios de investigación y los servicios de patología que rutinariamente están analizando muestras de tumor embebido en parafina. Pues permite el uso de láminas de parafina para cuantificar hasta 7 poblaciones sobre la misma lámina, obviando la necesidad del uso de nuevos equipos y utilizando los métodos de detección convencionales.

Clásicamente, la inmunohistoquímica se realiza con enzimas que, al metabolizar un sustrato, forman complejos coloreados en el tejido. Dentro de las enzimas más usadas se encuentra la peroxidasa de rábano, con la cual se pueden utilizar diferentes sustratos. El DAB (diaminobenzidina), es un sustrato insoluble, el cual se mantiene estable por años a temperatura ambiente después de realizar la marcación. Este sustrato se utiliza en los bancos de patología para el diagnóstico de enfermedades, por ejemplo, en el caso del cáncer de mama, se guardan láminas del tumor teñidas con hematoxilina y eosina, para realizar el diagnóstico morfométrico, y láminas de inmunohistoquímica marcadas con los receptores de hormonas y factores de crecimiento como ER, PR y HER2, y marcadores de proliferación tumoral como Ki67. Inclusive, en casos en los que el tumor no es fácilmente distinguible por morfología, se pueden hacer marcaciones con Pankeratinas para evaluar las células malignas de origen epitelial.

Estas láminas se mantienen por décadas en los servicios de diagnóstico sin perder las marcaciones realizadas, permitiendo el acceso a las láminas de diagnóstico de las pacientes en caso de requerirse en el futuro. Sin embargo, con la intención de estudiar a profundidad el infiltrado inmune tumoral, se vuelve necesario estandarizar técnicas que permitan la identificación de diferentes poblaciones, y la colocalización entre ellas y su relación con las células tumorales.

Para esto, Remark, *et al*., (2016) plantean utilizar el AEC (3-amino-9-etilcarbazol) como sustrato, el cual es soluble en etanol y puede ser fácilmente retirado por medio de la inmersión de las láminas en concentraciones de etanol con HCl al 1% (Figura 5).

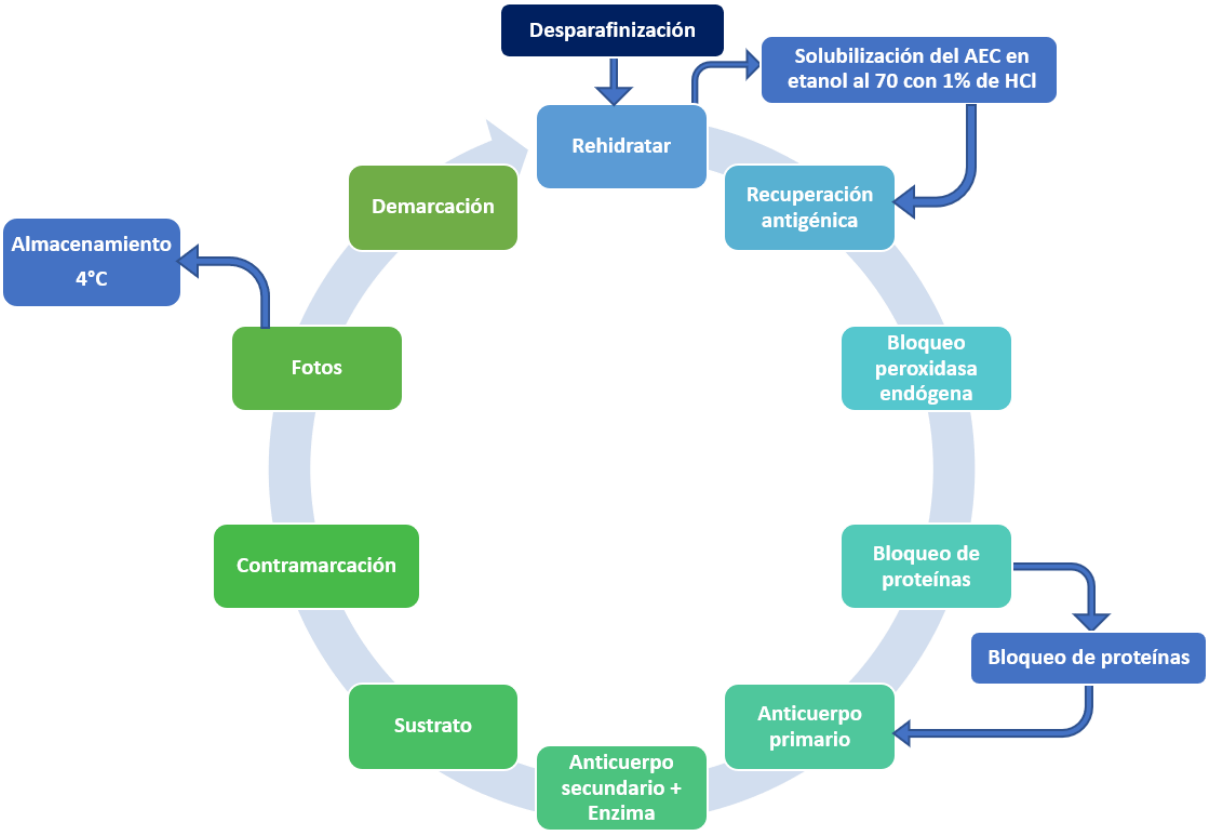

Figura 5. ***Estandarización marcación secuencial*:** Diagrama de flujo marcación de Inmunohistoquímica secuencial sobre lámina única .

La primera marcación inicia con el desparafinado del tejido a 60ºC, lo cual permite derretir la parafina, y pasar la lámina por Xileno, el cual es un agente orgánico que permite la disolución de esta. Posteriormente, el tejido se pasa por concentraciones decrecientes de etanol 96%, 70%, y 50% y por último, se deja en agua desionizada (milliQ, Millipore), con la intención de retirar los solventes orgánicos como el xileno y el formaldehído, y rehidratar el tejido (Figura 5).

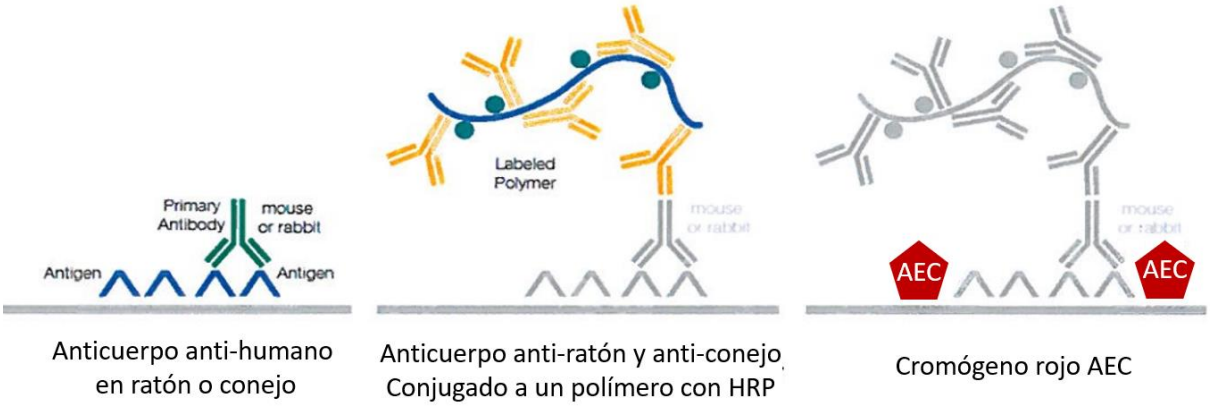

Figura 6.*Sistema de detección*. Anticuerpos utilizados para la detección de las proteínas de interés. EnVision System Dako. Tomado y modificado de [102]

En este punto, se debe hacer un paso de recuperación antigénica, el cual es fundamental, pues al momento de fijar el tejido en formaldehído, se forman puentes de hidrógeno entre las cadenas residuales de los aminoácidos, con lo cual se enmascaran los antígenos y el anticuerpo no puede reconocerlos de forma eficiente. Este paso se realizó con buffer de pH 9 y temperatura de 90ºC, según lo recomendado por la casa comercial productora de los anticuerpos (Tabla 1).

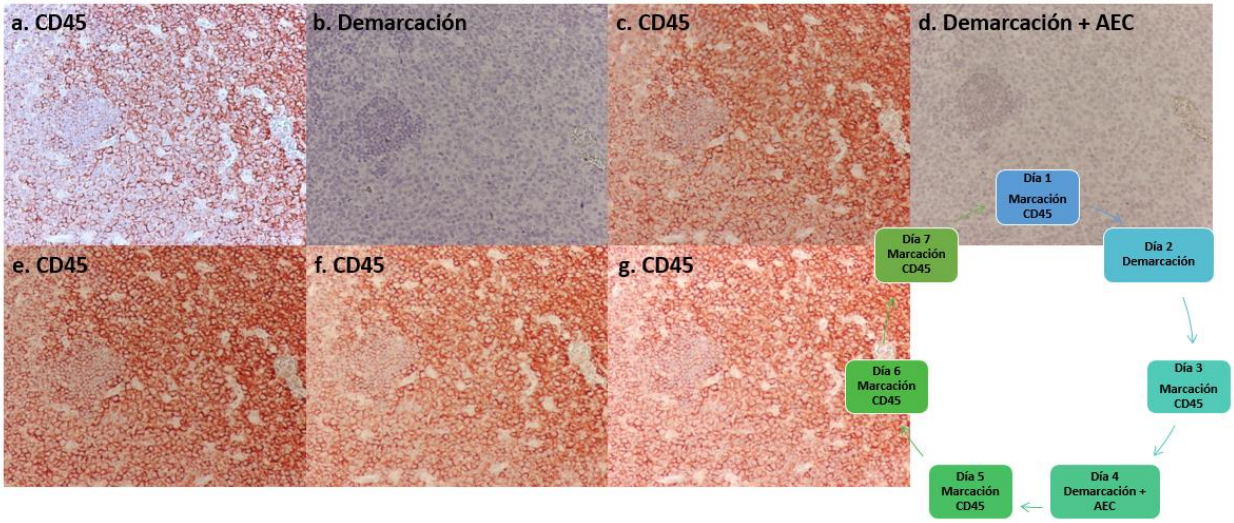

Figura 7. *Mantenimiento de la antigenicidad - Marcación secuencial CD45*. Aumento de 200X de un corte de amígdala de 3um para estandarización de la marcación secuencial del anticuerpo CD45. a. Primera marcación. b. Demarcación más tinción con hematoxilina. c. Segunda marcación. d. Demarcación más incubación con AEC y tinción con hematoxilina. e. Tercera marcación. f. Cuarta marcación y g. Quinta marcación.

Posteriormente, se deben realizar bloqueos para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos al tejido, y el ruido de fondo en la marcación causado por la peroxidasa endógena de los tejidos,

la cual reaccionará con el sustrato. El primer bloqueo se realiza con una solución rica en proteínas libre de suero. Y para el segundo, se utiliza una solución de peróxido al 3% en metanol (Figura 5).

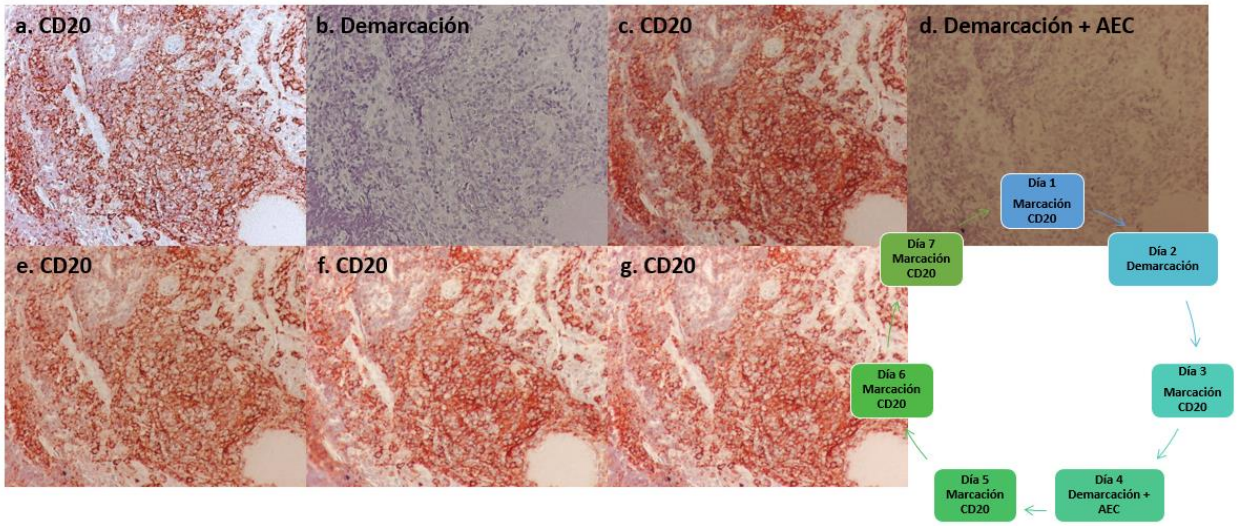

Figura 8. ***Mantenimiento de la antigenicidad - Marcación secuencial CD20***. Aumento de 200X de un corte de amígdala de 3um para estandarización de la marcación secuencial del anticuerpo CD20. **a.** Primera marcación. **b.** Demarcación más tinción con hematoxilina. **c.** Segunda marcación. **d.** Demarcación más incubación con AEC y tinción con hematoxilina. **e.** Tercera marcación. **f.** Cuarta marcación y **g.** Quinta marcación.

En este punto, el tejido ya está listo para la incubación con los anticuerpos, utilizamos una marcación indirecta, con la intención de aumentar la señal de la marcación, y utilizar el mismo anticuerpo de detección con los diferentes anticuerpos primarios (Tabla 1), que reconocían antígenos de las proteínas: CD45, CD68, CD20, CD3 y CD8. El anticuerpo secundario es de cabra y reconoce las fracciones constantes de inmunoglobulinas de ratón y conejo (especies de los anticuerpos primarios), adicionalmente, está conjugado a un polímero con peroxidasa de rábano como método de detección (Figura 6).

Por último, se realizó el paso de incubación con el sustrato AEC, el cual da una marcación de color rojizo, y contra marcación para ver la morfología tisular con hematoxilina y agua amoniacal para que la tinción fuera más azul que morada y se pudiera distinguir entre el AEC y la hematoxilina, permitiendo una buena contra marcación (Figura 6).

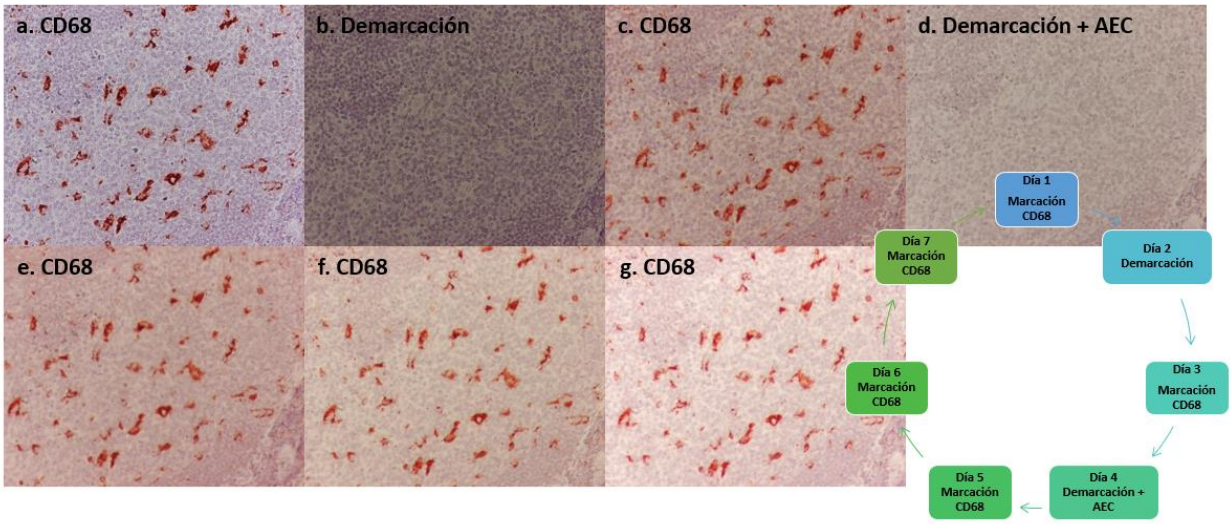

Figura 9. ***Mantenimiento de la antigenicidad - Marcación secuencial CD68****.* Aumento de 200X de un corte de amígdala de 3um para estandarización de la marcación secuencial del anticuerpo CD68. **a.** Primera marcación. **b.** Demarcación más tinción con hematoxilina. **c.** Segunda marcación. **d.** Demarcación más incubación con AEC y tinción con hematoxilina. **e.** Tercera marcación. **f.** Cuarta marcación y **g.** Quinta marcación.

En las marcaciones secuenciales se agregaron algunos pasos adicionales (Figura 5). El primero, corresponde a la demarcación del AEC, para esto, el tejido se sumerge en etanol al 70% con 1% de HCl, este paso permite solubilizar completamente el AEC y retirar la hematoxilina. Adicionalmente, se agrega un paso de bloqueo con una solución de PBS y suero fetal bovino al 5%, con la intención de disminuir cualquier unión inespecífica entre los anticuerpos y el tejido, que ya fue sometido a tinciones previamente. Por último, se disminuyó el tiempo de recuperación antigénica a 15 minutos, pues este paso resulta ser abrasivo con el tejido, y con las marcaciones secuenciales se desprende de la lámina.

Como resultados del primer objetivo, logramos la estandarización de la técnica de inmunohistoquímica secuencial sobre lámina única, con láminas de tejido de amígdala, las cuales son órganos linfoides secundarios que, con seguridad, contienen células que expresan los marcadores a ser evaluados en este trabajo. Logramos estandarizar hasta 7 ciclos de marcación, sin que se perdiese la antigenicidad de las epítopes a evaluar (Figs. 7-11). Utilizamos: CD45, como marcador de leucocitos totales (Figura 7), CD68 como marcador de macrófagos (Figura 8), CD20 como marcador de linfocitos B (Figura 9), CD3 como marcador de linfocitos T (Figura 10)

, CD8 como marcador de linfocitos T CD8 citotóxicos (Figura 11) y Pankeratinas como marcador de células de origen epitelial que permiten reconocer las células tumorales (Figura 12).

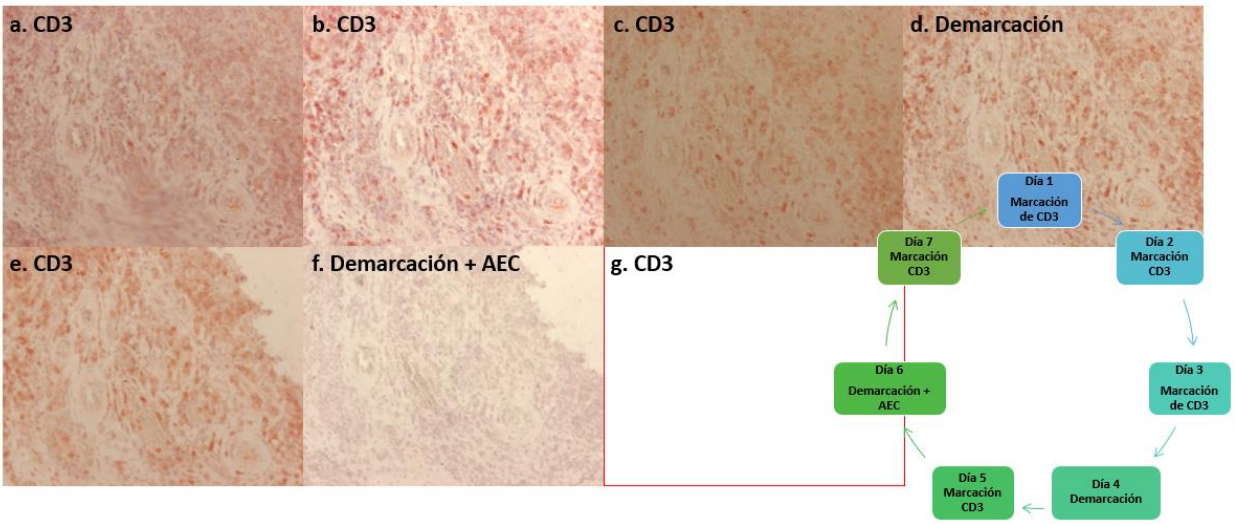

Figura 10. ***Mantenimiento de la antigenicidad - Marcación secuencial CD3***. Aumento de 200 X de un corte de amígdala de 3um para estandarización de la marcación secuencial del anticuerpo CD3. **a.** Primera marcación. **b.** Tercera marcación **c.** Segunda marcación. **d.** Demarcación más tinción con hematoxilina. **e.** Cuarta marcación. **f.** Demarcación más incubación con AEC y tinción con hematoxilina. y **g.** Quinta marcación.

En la figura 6, vemos la marcación secuencial del antígeno CD45, el cual es un marcador primitivo del linaje hematopoyético y representa poblaciones de leucocitos totales, este marcador es positivo en todas las subpoblaciones del sistema inmune, incluyendo células del sistema inmune innato, como células dendríticas, macrófagos y neutrófilos, que son las poblaciones que más se encuentran infiltrando tumores. Logramos ver una marcación uniforme y específica, que se localiza en la membrana celular, rodeando los núcleos.

Después de la primera marcación y de tomar las fotos, pasamos las láminas por la batería de etanoles para retirar el AEC, por la recuperación antigénica, bloqueamos la lámina y la volvimos a marcar con la hematoxilina, esto, con la intención de demostrar que logramos retirar por completo el AEC (Figura 6b).

Con la intención de evaluar si la lámina mantiene la antigenicidad, o si, por el contrario, la unión del primer anticuerpo no permite nuevas uniones, volvimos a marcar el mismo anticuerpo, una vez más, y logramos ver la misma morfología de la primera tinción, donde se mantiene la especificidad en la membrana celular rodeando el núcleo (Figura 6c).

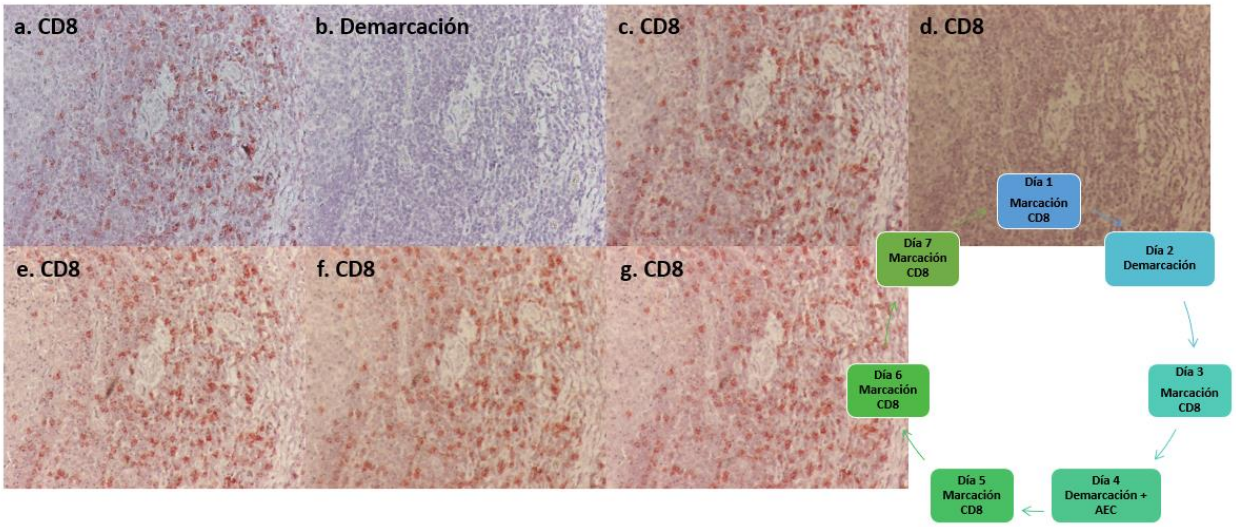

Figura 11. ***Mantenimiento de la antigenicidad - Marcación secuencial CD8****.* Aumento de 200X de un corte de amígdala de 3um para estandarización de la marcación secuencial del anticuerpo CD8. **a.** Primera marcación. **b.** Demarcación más tinción con hematoxilina. **c.** Segunda marcación. **d.** Demarcación más incubación con AEC y tinción con hematoxilina. **e.** Tercera marcación. **f.** Cuarta marcación y **g.** Quinta marcación.

Otro punto para considerar dentro de la marcación secuencial es la posibilidad de que los anticuerpos no se retirasen en su totalidad, y que la señal detectada correspondiese a una tinción debida a la misma señal de la primera marcación, o la acumulación de anticuerpos en el tejido. Para demostrar que esto no estaba sucediendo, nuevamente desteñimos las láminas, las pasamos por la batería de etanoles para retirar el AEC, por el paso de recuperación antigénica y los bloqueos, y por último incubamos las láminas con AEC. De esta forma, si en la lámina quedasen anticuerpos, y puntualmente anticuerpos secundarios conjugados a la peroxidasa, estos reaccionarían con AEC, y veríamos tinción en el tejido. De igual forma contramarcamos las láminas con hematoxilina después de la incubación con el sustrato y tomamos fotos, observando que no existe tinción rojiza correspondiente al sustrato (Figura 6d), por lo cual concluimos que los ciclos de destinción utilizados son suficientes para retirar por completo las marcaciones anteriores, retirando tanto la tinción del AEC, como la interacción proteína anticuerpo.

Por último, realizamos tres tinciones adicionales con el anticuerpo anti-CD45 demostrando que la antigenicidad de las proteínas en el tejido se mantiene (Figura 6 e, f y g). El principal problema que encontramos es que los diferentes ciclos de marcación y demarcación a los que se ven

sometidos las láminas si tienen un efecto en la adhesión del tejido a la lámina, y este se va desprendiendo, razón por la cual solo logramos entre 6 y 7 ciclos de tinción.

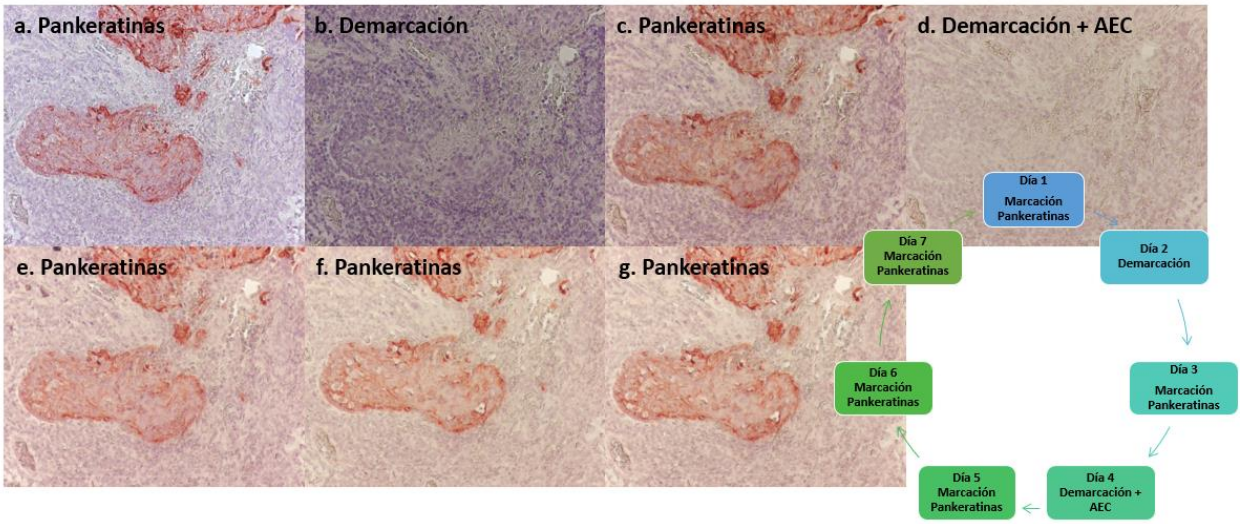

Figura 12. ***Mantenimiento de la antigenicidad - Marcación secuencial Pankeratinas***. Aumento de 200X de un corte de amígdala de 3um para estandarización de la marcación secuencial del anticuerpo Pankeratinas. **a.** Primera marcación. **b.** Demarcación más tinción con hematoxilina. **c.** Segunda marcación. **d.** Demarcación más incubación con AEC y tinción con hematoxilina. **e.** Tercera marcación. **f.** Cuarta marcación y **g.** Quinta marcación.

En resumen, los resultados encontrados con la proteína CD45, con la cual logramos hasta 5 tinciones específicas del anticuerpo anti-CD45 utilizado, también fue evidenciado para el resto de los anticuerpos que reconocen los marcadores: CD20 (Figura 7), CD68 (Figura 9), CD3 (Figura10), CD8 (Figura 11) y Pankeratinas (Figura12).

<u>Marcación de los anticuerpos en diferente orden no resulta en pérdida de la antigenicidad ni en inhibición alostérica.</u>

Otro potencial problema que se podría presentar con las marcaciones secuenciales es la inhibición alostérica sobre las proteínas cercanas espacialmente en la membrana celular, por la marcación con antígenos por ejemplo CD3 y CD8. Por esta razón, decidimos realizar el mismo set experimental anterior, donde marcamos una primera vez con un anticuerpo, desteñimos e incubamos con hematoxilina, teñimos nuevamente con un anticuerpo.

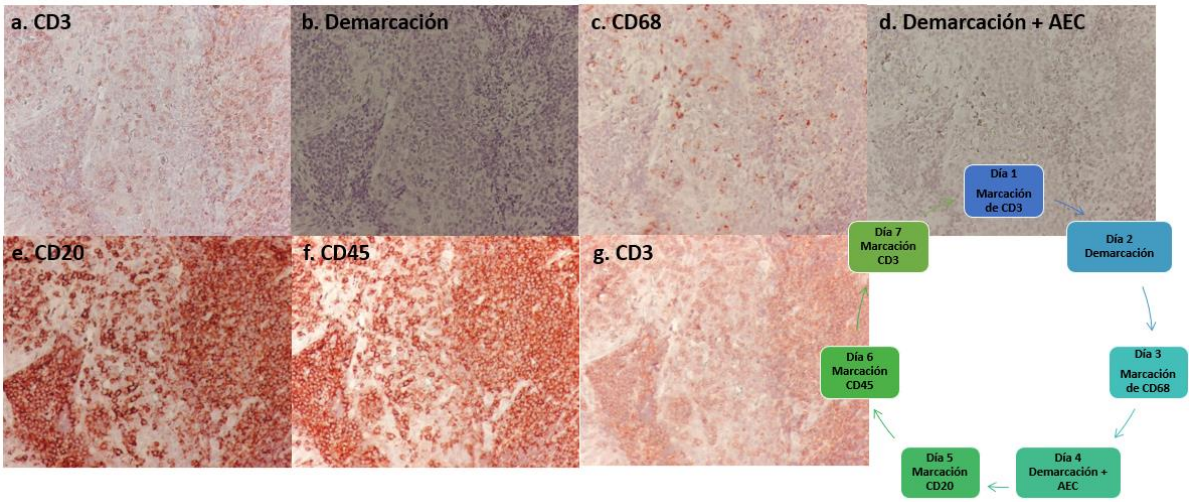

Figura 13. ***Evaluación del efecto estérico entre anticuerpos empezando con CD3****.* Aumento de 200X de un corte de amígdala de 3um para estandarización de la marcación secuencial de anticuerpos en diferente orden. **a.** Marcación CD3. **b.** Demarcación más tinción con hematoxilina. **c.** Marcación CD68. **d.** Demarcación más incubación con AEC y tinción con hematoxilina. **e.** Marcación CD20. **f.** Marcación CD45 y **g.** Marcación CD3.

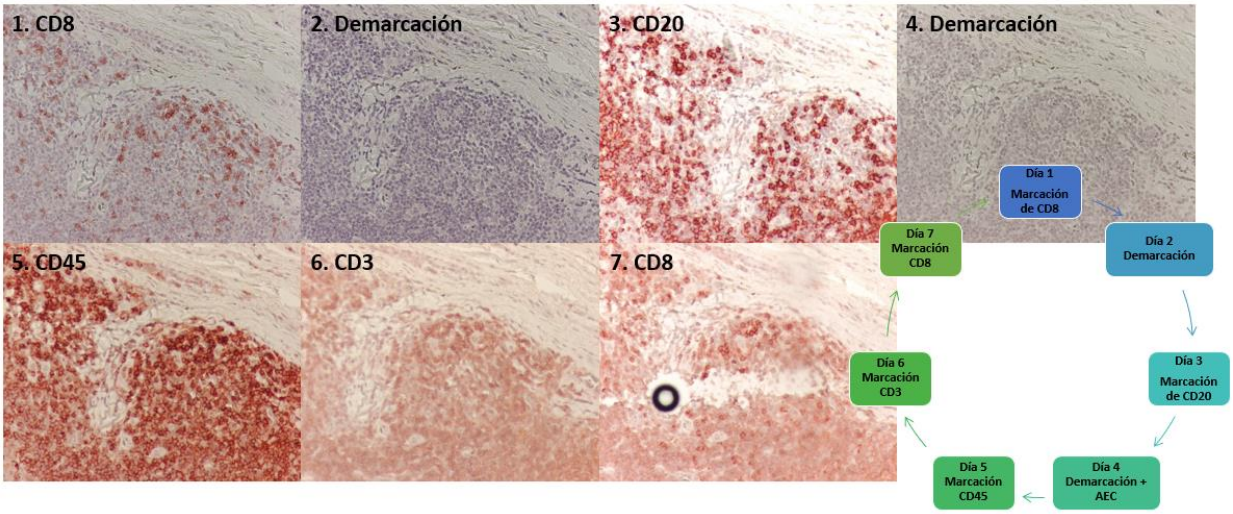

Figura 14 . ***Evaluación del efecto estérico entre anticuerpos empezando con CD8*****.** Aumento de 200X de un corte de amígdala de 3um para estandarización de la marcación secuencial de anticuerpos en diferente orden. **a.** Marcación CD8. **b.** Demarcación más tinción con hematoxilina. **c.** Marcación CD20. **d.** Demarcación más incubación con AEC y tinción con hematoxilina. **e.** Marcación CD45. **f.** Marcación CD3 y **g.** Marcación CD8.

Pero en este caso un anticuerpo diferente, desteñimos e incubamos nuevamente con AEC y hematoxilina, y luego teñimos una tercera, cuarta y quinta vez, con diferentes anticuerpos, tomamos cinco amígdalas y todas empezaron por un marcador en específico: CD3 (Figura 13), CD8 (Figura 14) CD20 (Figura 15), CD45 (Figura 16) y CD68 (Figura 17); luego fuimos

cambiando los anticuerpos en las subsiguientes tinciones. Por último, volvíamos a marcar el primero, esto con la intención de demostrar que los anticuerpos no tienen un efecto alostérico entre ellos, es decir, porque se marque un antígeno en una lámina, las proteínas cercanas en la membrana no pierden su antigenicidad (Figuras 13 -17).

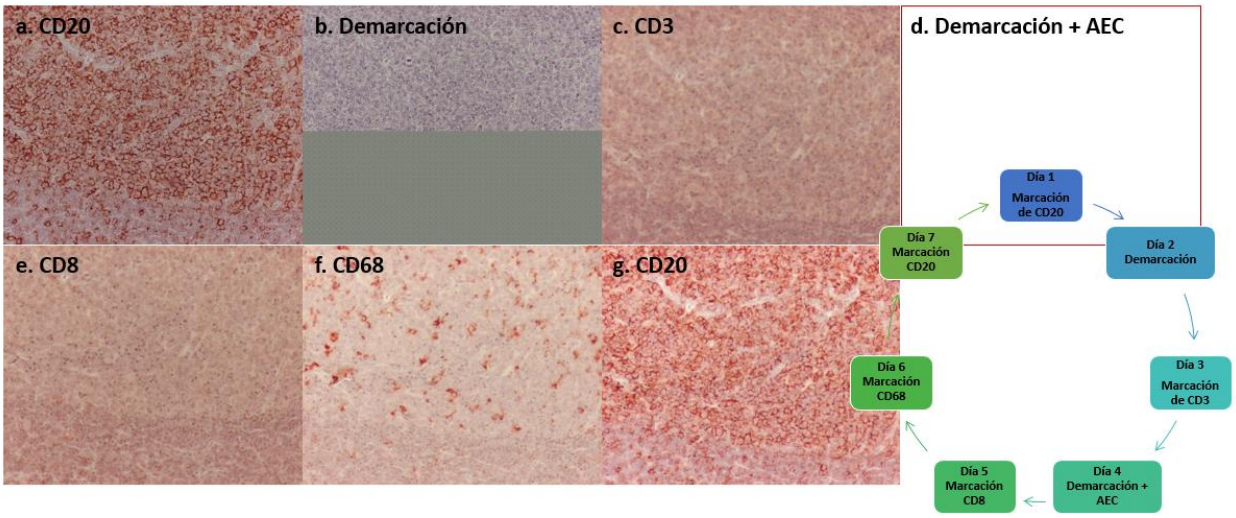

Figura 15. ***Evaluación del efecto estérico entre anticuerpos empezando con CD20***. Aumento de 200X de un corte de amígdala de 3um para estandarización de la marcación secuencial de anticuerpos en diferente orden. **a.** Marcación CD20. **b.** Demarcación más tinción con hematoxilina. **c.** Marcación CD3. **d.** Demarcación más incubación con AEC y tinción con hematoxilina. **e.** Marcación CD8. **f.** Marcación CD68 y **g.** Marcación CD20.

Los resultados mostrados en este capítulo nos permiten concluir que la ISSLU es una técnica de análisis de proteínas que permite evaluar la presencia de un antígeno, en el contexto de la morfología tisular, permitiendo evaluar el contexto tisular, a la vez que permite la marcación secuencial con los marcadores de interés (Figura 18).

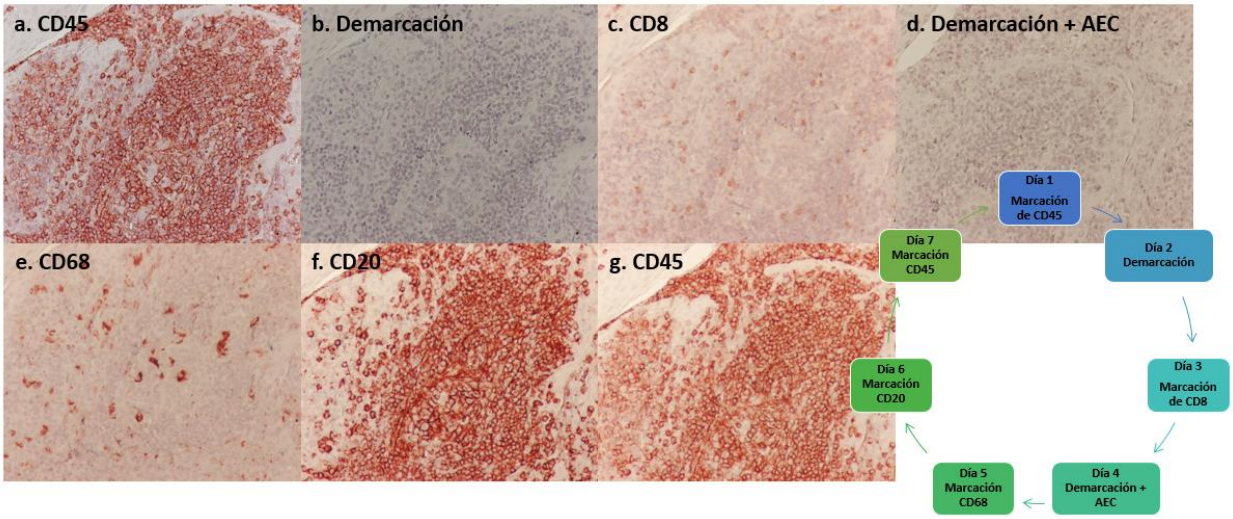

Figura 16 ***Evaluación del efecto estérico entre anticuerpos empezando con CD45.*** Aumento de 200X de un corte de amígdala de 3um para estandarización de la marcación secuencial de anticuerpos en diferente orden. **a.** Marcación CD45. **b.** Demarcación más tinción con hematoxilina. **c.** Marcación CD8. **d.** Demarcación más incubación con AEC y tinción con hematoxilina. **e.** Marcación CD68. **f.** Marcación CD20 y **g.** Marcación CD45.

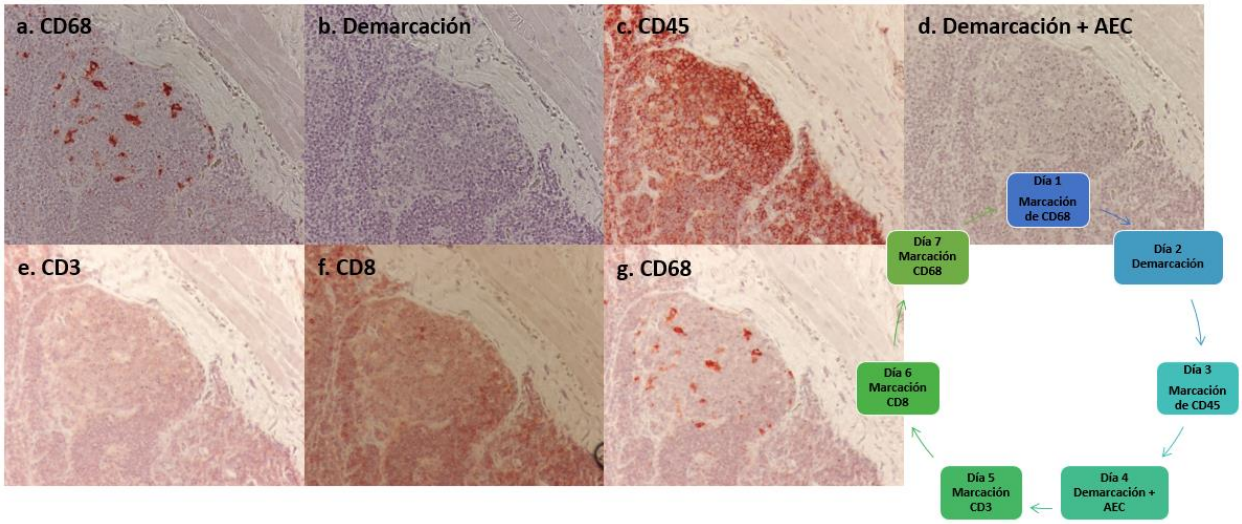

Figura 17 ***Evaluación del efecto estérico entre anticuerpos empezando con CD68.*** **Aumento** de 200X de un corte de amígdala de 3um para estandarización de la marcación secuencial de anticuerpos en diferente orden. **a.** Marcación CD68. **b.** Demarcación más tinción con hematoxilina. **c.** Marcación CD45. **d.** Demarcación más incubación con AEC y tinción con hematoxilina. **e.** Marcación CD3. **f.** Marcación CD8 y **g.** Marcación CD68.

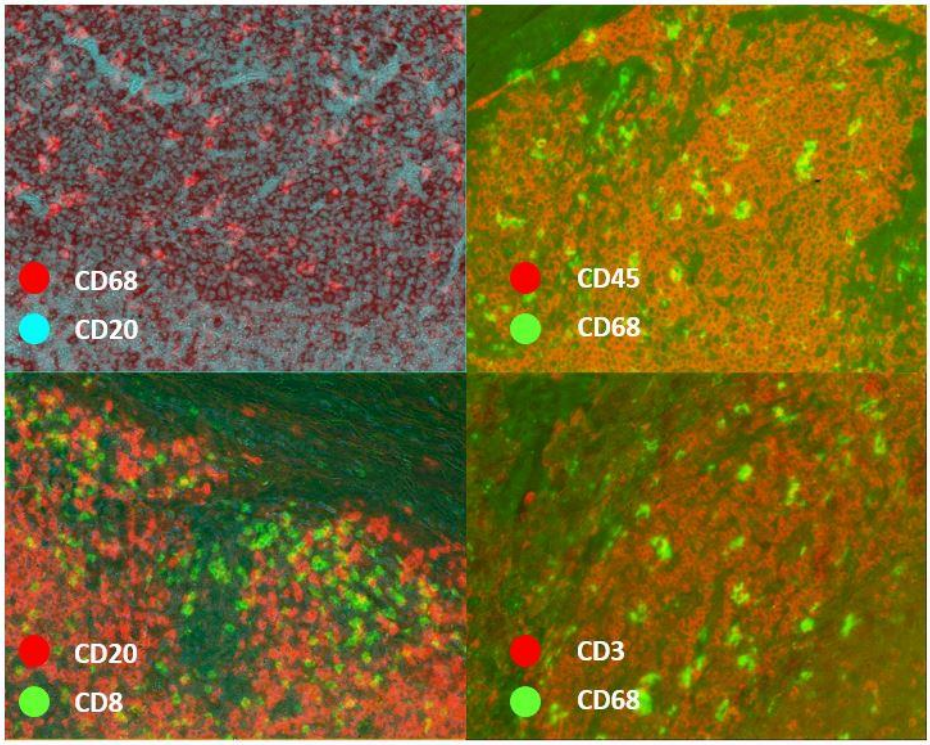

Figura 18. ***Sobreposición de marcadores.*** Aumento de 200X de cortes de amígdala marcados secuencialmente con todos los marcadores. La sobreposición se realiza utilizando el programa Fiji de ImageJ, asignándole filtros de colores a cada tinción con AEC.

7.2. Capítulo 2. Caracterización del infiltrado inmune tumoral en muestras pre-quimioterapia y muestras pos quimioterapia.

Con la intención de evaluar el efecto de la NAC en la infiltración del sistema inmune realizamos tres aproximaciones metodológicas, primero realizamos una revisión sistemática para sintetizar la de evidencia previamente publicada sobre el tema. Segundo, con la técnica de ISSLU, evaluamos la infiltración de leucocitos totales, macrófagos, linfocitos B, Linfocitos T totales y Linfocitos T CD8. Por último, hicimos una aproximación *in-silíco* utilizando el software CIBERSORTx, pues este permite la cuantificación de hasta 22 subpoblaciones de leucocitos que hacen parte del sistema inmune. Para lograrlo, tomamos datos libres de la base de datos European Genome -Phenome Archive EGA – Código de acceso GSE 123845, secuenciados y reportados por Hee Park y col en el 2020.

7.2.1. La NAC disminuye la infiltración de TILs y de Tregs medidas por FoxP3: Revisión sistemática y meta-análisis.

Resultados de la búsqueda y características de los estudios

La estrategia de búsqueda realizada llevó a una selección inicial de 623 artículos. En la fase de identificación se obtuvieron 257 artículos de Pubmed, 76 de Medline, 150 de Embase, 75 de Cochrane y 65 de BVS. Después de eliminar los duplicados, se identificaron 449 artículos. De estos estudios, 317 fueron excluidos basados en título y resumen. Posteriormente se realizó la lectura a texto abierto de los 132 artículos restantes lo cual llevó a la exclusión de 100 artículos (Anexo 2) y la inclusión de 32 estudios para el análisis cualitativo (Tabla 2), de los cuales 9 estudios fueron utilizados para los metaanálisis (Figura 19).

Los 32 estudios incluidos en esta revisión fueron publicados entre 2001 y 2022, incluyendo a un total de 2072 pacientes mayores de 18 años, que recibieron quimioterapia neoadyuvante como primera línea de tratamiento y a las cuales les fue evaluado el infiltrado inmune en la muestra tumoral prequimioterapia y en la muestra posquimioterapia. Los parámetros medidos en cada artículo se encuentran descritos en la tabla 2. Los resultados fueron clasificados en tres grupos: i) Linfocitos infiltrantes de tumor por H&E (53.1%), ii) Células (71.8%), y iii) marcadores o citoquinas (40.6%). Las poblaciones celulares o marcadores que fueron mayormente evaluados fueron los TILs (53.1%), CD8 (48.6%), FOXP3 (48.6%) y PD-L1 (31.2%). Adicionalmente, 19 de

los 32 artículos (59%) realizaron algún tipo de análisis del cambio en el infiltrado inmune con la respuesta clínica (Tabla 2).

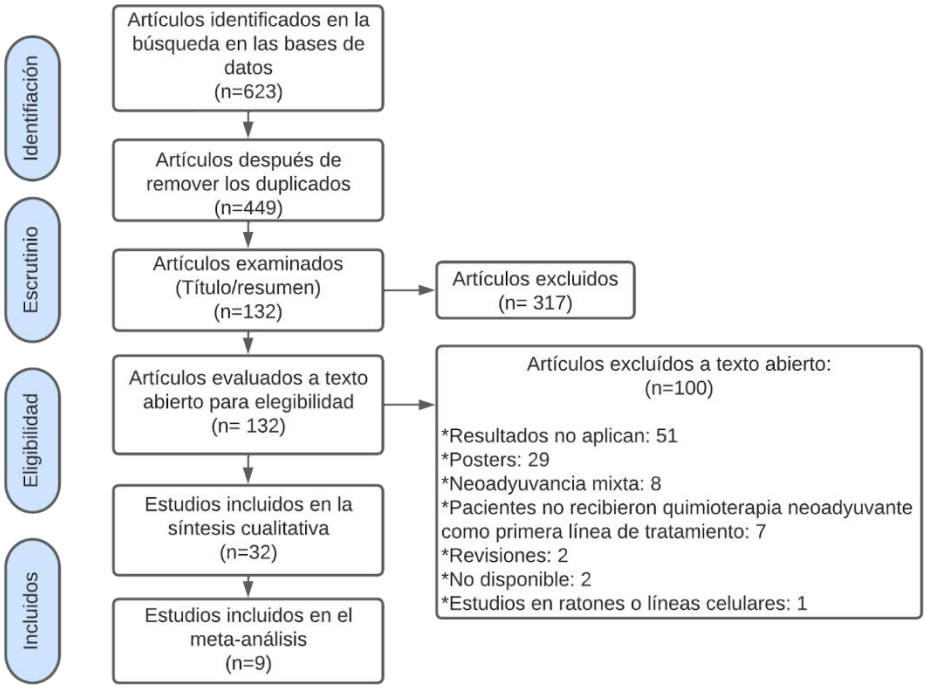

Figura 19. ***Diagrama de flujo de la revisión con criterios prisma.*** *L*a estrategia de búsqueda inicial permitió la identificación de 623 artículos, después de remover los duplicados, 449 artículos fueron revisados por título y resumen, se eliminaron 317 y 132 artículos fueron revisados a texto abierto. 32 artículos fueron incluidos en la síntesis cualitativa y 9 en los meta-análisis.

Categorización de la heterogeneidad

La composición del estado del infiltrado de los tumores ha sido un tema ampliamente estudiado con el que se persigue entender qué poblaciones celulares son deseables y de buen pronóstico para los pacientes [4]. Por este motivo, mediante esta revisión sistemática se buscó comparar la mayor cantidad de estudios que analizaron el infiltrado inmune en la línea base y después del tratamiento con quimioterapia neoadyuvante, para ver cómo este alteraba el estado inmune del tejido. En general, se encontró una alta heterogeneidad en los métodos utilizados para la medición de las diferentes poblaciones inmunes estudiadas en los artículos incluidos en esta revisión (Anexo 4). Encontramos heterogeneidad en dos niveles, el primero con respecto a la técnica usada, en los marcadores utilizados para definir las poblaciones y en los softwares para el análisis del transcriptoma. Y la segunda, a nivel de la información clínica de las pacientes

donde resaltan tres elementos: i) La clasificación histopatológica del cáncer de mama evaluado, ii) el tratamiento recibido y iii) la arquitectura espacial del microambiente.

#	Autor y año	Células o marcador medido
1	Abdel-Fatah, 2014 [103]	TILs
2	Abdelrahman, 2021 [46]	PD-L1, FoxP3 y TILs
3	Alhesa, 2022 [104]	TILs estromales y PD-L1
4	Chan, 2014 [105]	CD8, Foxp3 and CD8/Foxp3
5	Demaria, 2001 [83]	TILs estromales, TILs intratumorales, CD3 y CD8
6	Demir 2013 [47]	FoxP3
7	Dieci 2020 [106]	PD-L1, CD8, FOXP3 y TILs
8	García-Martínez 2014 [55]	CD4, CD8, CD3, CD20, FOXP3 y CD68
9	Graeser 2021 [107]	TILs estromales, CD4, CD8, PD1 y PD-L1
10	Grecco-Hoffman 2021 [108]	TILs estromales y PD-L1
11	Hee Park 2020 [97]	TILs
12	Hornychova 2008 [56]	CD3, CD68, CD83, CD56, S100 y CD1a
13	Kaewkangsadan 2016 [48]	TILs estromales e intratumorales, CD4, CD8, FOXP3, CTLA-4, PD-1, IL-1, IL-2, IL-4, IL-10, IL-17, IFN-y, TGF-B y PD-L1
14	Kaewkangsadan 2017 [109]	TIMs (M1-M2), TINs y DCs
15	Ladoire 2008 [110]	CD3, CD8, FOXP3 y CD8/FOXP3
16	Ladoire 2011 [49]	CD8, FOXP3 y CD8/FOXP3
17	Lee 2019 [50]	NLR, TILs, CD4, CD8, FOXP3 y PD-L1
18	Li 2019 [111]	TILs y IL8
19	Liang 2021 [112]	TMB, DC50, CD3, CD8, CD4, PD1, TIM3 y CD4/CD8
20	Miyashita 2015 [81]	CD8, FOXP3 y CD8/FOXP3
21	Nadin 2014 [113]	TILs
22	Naofumi Oda 2012 [52]	CD8, FoxP3 y IL-17
23	Pelekanou 2018 [114]	TILs y PD-L1
24	Sarradin 2021 [115]	TILs, TIM3, LAG3 yPD-L1
25	Urueña, 2022 [116]	TILs estromales e intratumorales, CD45, CD3, CD4, CD8, CD20, CD68 y FoxP3.

26	Vanguri 2022 [51]	TILs estromales,CD3, CD8, CD68 y FOXP3
27	Varadan 2016 [117]	Immune index (141 genes)
28	Verma 2015 [118]	TILs, CD56, IL-2, IFNg y TGFb
29	Waks 2019 [53]	TILs, CD8. Foxp3, M1, M2 y DCs
30	Wang 2018 [119]	CD8, PD-1, PD-L1 y LAG-3
31	Wesolowski 2020 [120]	TILs, CD8, PD-1 y PD-L1
32	Zhang 2019 [54]	FoxP3, CD25 y PD-L1

Tabla 2. ***Artículos incluidos en la revisión sistemática*.** 32 artículos incluidos en la síntesis cualitativa de la información.

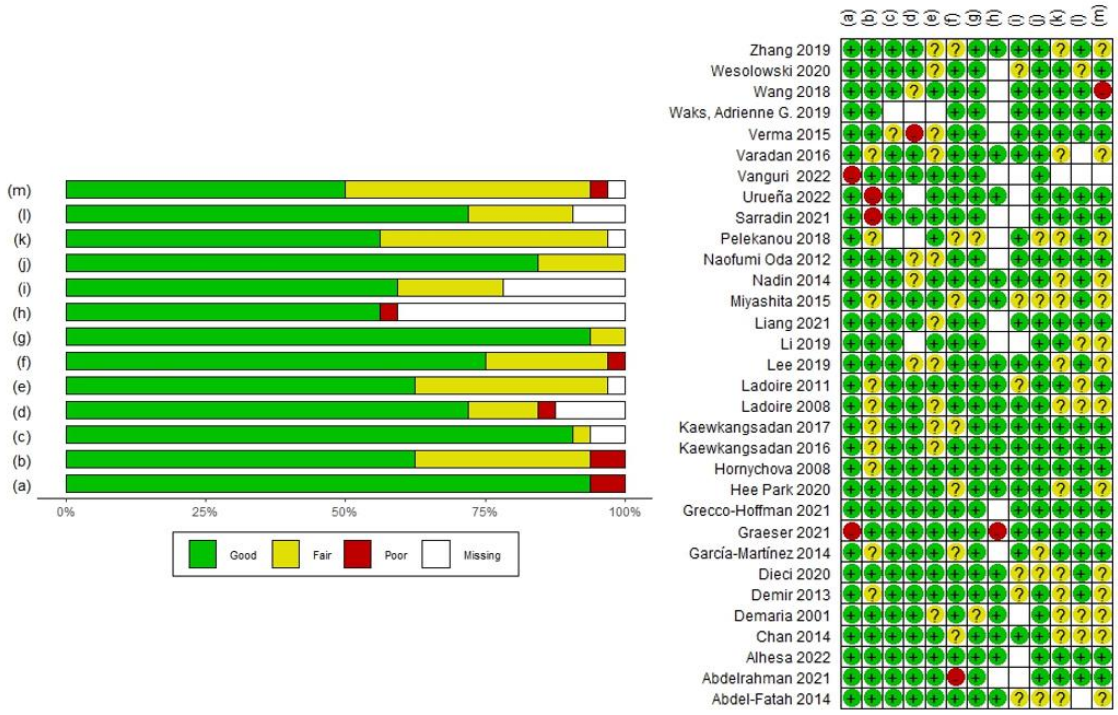

Figura 20. ***Evaluación del riesgo de sesgo a*.** Resumen de la evaluación del riesgo de sesgo de los artículos incluidos. **b.** Evaluación del riesgo de sesgo individual. Se utilizo la herramienta de evaluación de calidad del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (**NIH**) para estudios antes y después (Pre-Post) sin grupo de control que evalúa las siguientes variables: a) La pregunta de estudio y/u objetivo del estudio es clara. b) Los criterios de elegibilidad para la población de estudio se especifican y describen de antemano. c) Los participantes del estudio eran representativos de la población de interés. d) Todos las participantes que cumplieron los criterios de elegibilidad fueron incluidas. e) El tamaño de la muestra fue lo suficientemente grande para brindar confianza en los resultados. f) La intervención se describió claramente y se administró a toda la población del estudio. g) Las medidas de resultado fueron claramente definidas, confiables y evaluadas en todos las participantes del estudio. h) Las personas que evaluaron los resultados estaban cegadas a las intervenciones de los participantes i) Las pérdidas durante el seguimiento después del inicio fueron del 20% o menos y las pérdidas durante el seguimiento se tuvieron en cuenta en el análisis. j) Se examinaron los métodos estadísticos para los cambios en los resultados antes y después de la intervención. Se realizaron pruebas estadísticas que proporcionaron valores p para los cambios antes y después de la intervención. k) Se describe

claramente si un comité de ética aprobó el protocolo o si los pacientes firmaron un formulario de consentimiento informado. l) Se describieron los anticuerpos, clones y marca utilizados en el marcaje (Para la técnica que aplica). m) Los resultados se presentaron claramente.

Riesgo de sesgo:

La Figura 20 se muestra que el 6% de los estudios tuvo problemas con la claridad de los objetivos del estudio. El 38% no describieron completamente los criterios de selección y elegibilidad de la población; el 31% tuvo problemas para describir sus criterios de selección; y el 34% tuvo dificultad para describir el cálculo de la muestra. el 21% no describió claramente las intervenciones; El 40% no describió claramente si su protocolo fue revisado y aprobado por un comité de ética y el 46% de los artículos tiene dificultades para presentar los resultados (Figura 20).

Linfocitos Infiltrantes del Tumor (TIL)

De 32 artículos incluidos en esta revisión sistemática, 18 estudios (53.1%) midieron la infiltración de linfocitos en el tumor (TILs) por medio de la evaluación morfológica de láminas de H&E. De estos 17 artículos, cuatro reportaron disminución en el porcentaje de TILs pos-quimioterapia [97, 111, 114, 120], dos reportaron un aumento de TILs [50, 113] y 11 no reportaron cambios significativos entre las muestras pre y posquimioterapia [46, 48, 53, 83, 103, 104, 106, 108, 115, 116, 118] (Tabla 3). Por su parte Urueña y cols, además de evaluar TILs de forma morfológica, evaluaron la expresión de CD45, marcador de leucocitos totales, por inmunohistoquímica el cual no cambió significativamente antes y después de la NAC (Tabla 3) [116].

Artículo	Tendencia de TILs
Abdel-Fatah, 2014 [103]	= NR-p
Abdelrahman, 2021 [46]	= NS-p
Alhesa, 2022 [104]	= NS-p
Demaria 2001 [83]	= NS-p
Dieci 2020 [106]	= NS-p
Grecco-Hoffman, 2021 [108]	= NS-p
Hee Park, 2020 [97]	⇩**
Kaewkangsadan, 2016 [48]	Respondedoras = NS-p No respondedoras = NS-p

Lee, 2019 [50]	⇧ NR-p
Li, 2019 [111]	Respondedoras: ⇩*** No Respondedores = NS-p
Nadin, 2014 [113]	Estromal ⇧** Tumoral ⇧***
Pelekanou, 2018 [114]	⇩ NR- p
Sarradin, 2021 [115]	= NS-p
Urueña, 2022 [116]	Estromal = NS-p Tumoral = NS-p
Verma, 2015 [118]	= NR-p
Waks, 2019 [53]	= NS-p
Wesolowski, 2020 [120]	= NR-p
*=p0.05, **=p0.01, ***=p0.001; NS-p: Valor P no significativo; NR-p: Valor P no reportado	

Tabla 3. ***Tendencias en el cambio de TILs pre y pos-NAC.*** De los 32 artículos incluidos, 17 midieron la infiltración de TILs antes y después de la NAC. Los artículos en verde reportan un aumento pos-NAC, los artículos en rojo reportan una disminución pos-NAC y los artículos en amarillo no reportan cambios pre y pos-NAC

Únicamente dos de los 17 artículos se lograron comparar en el metaanálisis de TILs (Figura 21), el cual reporta una disminución significativa de los TILs posquimioterapia (p<0,00001) con una diferencia media de 0,85 (95% IC [0,50, 1,20]) y con una heterogeneidad baja (I2=0%) [97, 121].

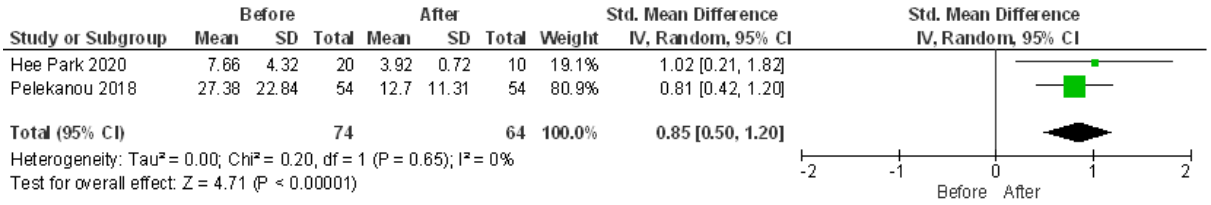

Figura 21. ***Meta-análisis TILs.*** Influencia de NAC en la densidad de TILs de tumores BC. Forest plot para los resultados de la densidad de TILs antes y después de NAC. El forest plot muestra la SMD (cuadrados) y el intervalo de confianza del 95 % de los estudios individuales. El rombo en cada gráfico indica la estimación general y el intervalo de confianza del 95%.

De los artículos que midieron TILs antes y después de la quimioterapia, únicamente seis hicieron correlaciones entre el cambio de los TILs y la respuesta clínica de las pacientes al tratamiento. Dieci, *et al*., (2020) reportaron correlaciones entre el aumento de TILs en muestras posquimioterapia y mayor DFS en pacientes con RD [106]. Por el contrario, Li, *et al*., (2019) reportó que, en pacientes con pCR el conteo de TILs fue significativamente menor en las muestras pos, mientras que en las pacientes con RD no hay diferencia significativa entre TILs

pre y posquimioterapia [111]. Adicionalmente cuatro trabajos no encontraron asociaciones significativas entre el cambio de TILs pre vs posquimioterapia y las variables clinicopatológicas [50, 53, 108, 113].

Macrófagos (Mφ)

Los Mϕ son una población altamente heterogénea y su caracterización utilizando proteínas de membrana no está aún del todo definida. De los 32 artículos incluidos en la revisión, 5 (15%) midieron la infiltración de estas células, sin embargo, la definición de esta población celular, según los marcadores reportados varió entre estudios (Tabla 4). Cuatro de estos artículos usaron CD68 particularmente [56, 116, 121] utilizaron este marcador para definir Mϕ totales, mientras que [109] usó CD68 para delimitar los Mϕ -M1 (pro-inflamatorios), y CD163 para los Mϕ-M2 (antiinflamatorios). Por último, otro trabajo hizo la medición de esta población con el método NanoString, utilizando el panel PanCancer IO360, pero por la alta heterogeneidad de los Mϕ, se determinaron un set de genes asociados a una respuesta M1 y otro set para una respuesta M2 [53].

A nivel global, no se encontró un consenso entre los artículos que midieron la infiltración de estas células. Cuatro de los cinco artículos utilizaron IHQ para la determinación del infiltrado, en dos de ellos se reportó una disminución de Mϕ infiltrantes de tumor en respuesta a la NAC, aunque en uno de ellos esta disminución se observó a nivel estromal y no intraepitelial [56, 121]. En los otros dos artículos no se observaron diferencias significativas [109, 116]. En el estudio que hizo la medición con NanoString se encontró un aumento global de los Mϕ pero al ver específicamente los genes asociados a una respuesta proinflamatoria, los genes de citoquinas como CXCL9 y TNF, y del factor de transcripción NotcWEh1 se vieron disminuidos post quimioterapia, mientras que genes de receptores como el TLR4, CD40, Fas y de la IL-15 aumentaron [53].

En cuanto a respuesta clínica, solo dos artículos correlacionaron la pCR y la sobrevida (OS) de las pacientes con el cambio del infiltrado inmune de los Mϕ pro-inflamatorios y en ningún caso encontraron significancia estadística [55, 109]. Por otro lado, la infiltración de los Mϕ antiinflamatorios se midió en dos de los cuatro artículos; en uno de ellos no se encontró un cambio significativo en respuesta a la quimioterapia neoadyuvante [109]. En contraste, Waks, *et al*., (2019) observó un aumento de CD163 en las muestras post quimioterapia, acompañado de

un aumento en genes de quimioquinas y citoquinas relacionados a este fenotipo como IL-10, TGFb, CCL2, CCL13, CCL14, de marcadores de membrana como CD36, CD209, CD115, MRC1, y de factores de transcripción como STAT3 y PPARG [53]

Tan solo el trabajo de Kaewkangsadan, *et al*., 2017 correlacionó el infiltrado de los Mϕ-M2 con la respuesta clínica y se encontró que los niveles altos de TIMs (CD163+) en cáncer de mama se asociaban significativamente con un GPR y pCR después de 8 ciclos de NAC. Asimismo, también se pudo encontrar una asociación significativa con el estado de ER y el grado del tumor, los cuales se asociaron positivamente con las pCR [109].

Artículo	Tendencia de células
Abdelrahman 2021 [46]	FoxP3 ⇩**
Chan 2014 [105]	CD8 **Respondedores** ⇧*** CD8 **No Respondedores**⇧*** FoxP3 **Respondedores** ⇩*** FoxP3 **No Respondedores** ⇩ **NS-p** CD8/FoxP3 **Respondedores**⇧*** CD8/FoxP3 **No Respondedores**⇧***
Demaria 2001 [83]	CD3 **=NR-p**
Demir 2013 [47]	FoxP3 ⇩***
Dieci 2020 [106]	CD8 ⇧* FoxP3 **=NS-p**
García-Martínez 2014 [55]	CD3 **=NS-p** CD4 ⇩** CD8 ⇧*** FoxP3 **=NS-p** LB ⇩* M2 ⇩*
Graeser 2021 [107]	Estroma CD4+ ⇧*** CD8+ ⇧*** Células T ⇧*** CD4+/CD8+ **= NS-p** Tumor CD4+ ⇧*** CD8+ ⇧*** Células T ⇧*** CD4+/CD8+ **= NS-p**
Hornychova 2008 [56]	CD3 **Estromales** ⇧* CD3 **Intraepiteliales** ⇧**

	NK **Estromales ⇧**** NK **Intraepiteliales =NS-p** M2 **Estromales ⇩**** M2 **Intraepiteliales =NS-p** DCs(CD1a) **Estromales ⇧*** DCs (CD1a) **Intraepiteliales =NS-p** DCs(S100) **Estromales ⇧*** DCs (S100) **Intraepiteliales =NS-p** DCs(CD83) **Estromales ⇧***** DCs (CD83) **Intraepiteliales =NS-p**
Kaewkangsadan 2016 [48]	CD4 **Estromales ⇧**** CD4 **Intratumorales ⇧**** CD8 **Estromal =NS-p** CD8 **Tumoral =NS-p** FoxP3 **Estromal: ⇩***** FoxP3**Tumoral: ⇩*****
Kaewkangsadan 2017 [109]	TINs **Estromales =NS-p** TINs **Intratumorales =NS-p** M1 **=NR-p** M2 **=NR-p** DCs (CD1a) **Estromales = NS-p** DCs (CD1a) **Intratumorales ⇧***
Ladoire 2008 [110]	**CD3 =NR-p** **CD8 =NR-p** **FoxP3 ⇩ NR-p**
Ladoire 2011 [49]	CD8 **=NS-p** FoxP3 **⇩ NR-p** CD8/FoxP3 **=NR-p**
Lee 2019 [50]	CD4 **⇧ NR-p** CD8 **⇧ NR-p** FoxP3 **⇩ NR-p** CD8/FoxP3 **⇧ NR-p**
Liang 2021 [112]	TMB **⇩**** DC50 **=NS-p** CD3 **⇧*** CD4 **=NS-p** CD8 **⇧*** CD4/CD8 **⇩***
Miyashita 2015 [81]	CD8 **⇧ NR-p** FoxP3 **=NR-p** CD8/FoxP3 **=NR-p**
Naofumi Oda 2012 [52]	CD8 **⇩***** FoxP3 **⇩*****
Urueña, 2022 [116]	CD45 **=NS-p** CD3 **=NS-p** CD4 **=NS-p** CD8 **=NS-p** CD20 **=NS-p**

	FoxP3 =NS-p CD68 =NS-p
Vanguri 2022 [51]	CD3 =NS-p CD3+CD8-FOXP3- =NR-p CD68 =NS-p CD8 ⇩*** FoxP3 ⇩*
Varadan 2016 [117]	Immune index =NS-p
Verma 2015 [118]	NK =NR-p
Waks 2019 [53]	CD8 = NR-p FoxP3 ⇩ NR-p M1 ⇧* M2 ⇧*/⇩* DCs ⇧***
Wang 2018 [119]	CD8⇧**
Wesolowski 2020 [120]	CD8 total = NR-p CD8 Intratumoral = NR-p
Zhang 2019 [54]	FoxP3 ⇩**
* p0.05, **p0.01, ***p0.001; NS-p: Valor P no significativo; NR-p: Valor P no reportado.	

Tabla 4. ***Tabla de tendencias células*.** De los 32 artículos incluidos, 24 evaluaron alguna población celular por IHQ o por perfil transcripcional antes y después de la NAC.

Neutrófilos

Sólo 1 artículo (3,1%) midió la presencia de Neutrófilos Infiltrantes de Tumor (TINs), utilizando el marcador CD66b, tanto a nivel intratumoral como estromal, en dos grupos de pacientes: con y sin metástasis. Este análisis no reportó diferencias significativas en la infiltración de este subtipo celular entre las muestras pre y post quimioterapia en ningún grupo Altos niveles de TINs se han asociado con pobre DFS y OS, sin embargo, en lo reportado en este trabajo no se encontró significancia entre el cambio de células CD66b+ y la respuesta patológica [109].

NKs

Las células NKs se midieron por IHQ a través del marcador CD56 en dos de los 32 artículos (6,2%) incluidos en esta revisión. Verma, *et al*., no reportaron cambios en respuesta a la NAC [118]. Por otro lado, Hornychova, *et al*., (2008) encontró un aumento significativo de las células NKs a nivel estromal, pero no a nivel intraepitelial [56]. Ninguno encontró una asociación significativa entre el cambio de células NK en respuesta a la NAC y la respuesta clínica.

Células Dendríticas

Dentro de la revisión pudimos encontrar 6 diferentes marcadores: CD1a, CD83, S100, CD209, CCL13, HSD11B para identificar DCs. El marcador CD1a, usado para describir DCs inmaduras, fue evaluado en dos artículos de manera intratumoral y estromal [56, 109], encontrando en el caso de Kaewkangsadan, *et al*. (2017) [109], una disminución significativa pos-quimioterapia a nivel intratumoral mientras que Hornychova, *et al*., (2008) [56] reportó un aumento significativo a nivel estromal, adicionalmente, utilizando la proteína CD83, relacionada con la maduración de las DCs, no reportó cambio en la infiltración de DCs maduras a nivel intraepitelial, pero sí un aumento significativo pos-quimioterapia a nivel del estroma. Por último, utilizando la proteína S100 reportaron un aumento significativo únicamente a nivel estromal. [56].

Por otra parte, en un estudio se realizó la evaluación de DCs por medio de Nanostring, el cual define esta población por medio de los marcadores CD209, CCL13 y HSD11B, encontrando que existe un aumento significativo de las DCs posterior a la quimioterapia [53]. Teniendo en cuenta estos resultados en conjunto, es posible decir que hay una mayor presencia en el tumor de las DCs después de la quimioterapia. No se hicieron análisis entre el cambio pos-quimioterapia de esta población y la respuesta clínica de los pacientes.

Linfocitos B

Sólo en dos artículos de los 32 analizados (6,2%), se midió la infiltración de LB. Uno de ellos reportó una disminución significativa en respuesta a la NAC [55]. En contraste, en el segundo artículo no observaron ningún cambio en respuesta a la NAC utilizando el mismo marcador CD20 [116]. Para la disminución reportada por García-Martínez, *et al*., (2014), se encontró una asociación significativa con una mejor pCR.

Linfocitos T

La determinación de los Linfocitos T (LTs) se hizo utilizando el marcador CD3 y seis de los 32 artículos (18,7%) incluidos midieron la infiltración de estas células. En dos de estos trabajos se reportó un aumento en la infiltración de los LT en las muestras pos-quimioterapia [56, 112]. En los otros cuatro artículos no se encontraron diferencias significativas entre las muestras pre y pos, aunque Demaria, *et al*., (2001) describen que hay un cambio de localización de los LT, estando en las muestras pre en el estroma y las pos intraepiteliales [83]. Asimismo, en el

metaanálisis realizado en el cual se contrastaron los datos reportados por dos de los cuatro artículos [55, 56] no se encontró una significancia (p=0.16) en la infiltración post tratamiento en comparación al infiltrado en las muestras prequimioterapia, con una diferencia media de 0.18 (95% CI [-0.07, 0.43]) y una heterogeneidad baja (I2=13%) (Figura 22).

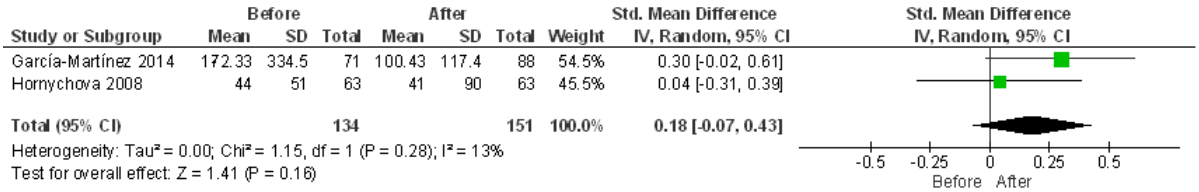

Figura 22. ***Meta-análisis linfocitos T CD3+*** Influencia de NAC en la densidad de LT-CD3+ de tumores BC. Forest plot para los resultados de la densidad de LT-CD3+ antes y después de NAC. El forest plot muestra la SMD (cuadrados) y el intervalo de confianza del 95 % de los estudios individuales. El rombo en cada gráfico indica la estimación general y el intervalo de confianza del 95%.

Dos trabajos evaluaron la relación entre el cambio en la infiltración de los LT y la respuesta clínica. Únicamente Garcia-Martínez *et al*., (2014) encontró una asociación en la disminución de estas células en respuesta a la NAC con una mejor pCR y mayor sobrevida medida en OS y DFS [55, 109].

Linfocitos T CD4

Por su lado, la medición de linfocitos T ayudadores CD4+ fue realizada en cinco artículos (15,6%), de los cuales dos reportaron una disminución en respuesta a la NAC [55], [48]. Dos no observaron cambios significativos a nivel global [48, 112, 116]. Aunque en uno de ellos se reportó una disminución significativa en las pacientes que mostraron una buena respuesta clínica [112]. Por último, Lee *et al*, (2019) encontraron un aumento significativo de esta población después de la quimioterapia [50].

Para el meta análisis realizado en esta revisión sólo se pudieron incluir dos artículos que reportaban tendencias contrarias, por lo cual no encontramos diferencia estadísticamente significativa (p=0.09) (La diferencia media encontrada fue de 0.3 (95% CI [-0.05,0.65], con un heterogeneidad relativamente baja (I2=36%). Por lo que no se pudo establecer un patrón de comportamiento para la infiltración de estas células en respuesta a la quimioterapia neoadyuvante. [50, 55].

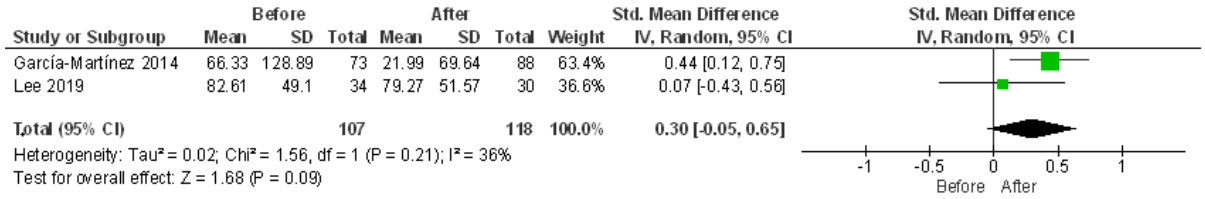

Figura 23. ***Meta-análisis linfocitos T CD4+*** Influencia de NAC en la densidad de LT-CD4+ de tumores BC. Forest plot para los resultados de la densidad de LT-CD4+ antes y después de NAC. El forest plot muestra la SMD (cuadrados) y el intervalo de confianza del 95 % de los estudios individuales. El rombo en cada gráfico indica la estimación general y el intervalo de confianza del 95%.

Garcia Martínez., *et al*. (2014) evaluó la correlación entre la disminución de estas células y la respuesta clínica, encontrando que en los pacientes que tuvieron una menor presencia de CD4 post quimioterapia contaron con una mejor pCR [55].

Linfocitos T CD8

El marcador CD8 fue evaluado en 15 de los 32 artículos. Tres reportaron una disminución de esta población después de la NAC ([51, 52, 120] mientras que siete reportaron un aumento para esta población [55, 81, 97, 105, 106, 112, 119]. Por su parte, cinco encontraron que no existían cambios significativos en respuesta a la NAC [48, 49, 53, 110, 116].

Con el marcador CD8 fue posible realizar diversos metaanálisis teniendo en cuenta la distribución en el microambiente tumoral. En primer lugar se hizo la comparación en tres artículos del conteo de CD8 totales, observando que no hay un cambio significativo de estas células pos-NAC, con una diferencia media de -0.17 (95% CI [-0.46, 0.13], p=0.27) y una heterogeneidad baja (I2=0.27%) (Figura 24) [50, 55, 120]. Posteriormente, se realizó el análisis para la fracción de CD8 infiltrantes de tumor en dos artículos, encontrando que no existen cambios significativos después del tratamiento en la infiltración de LT-CD8 pos-NAC, con una diferencia media de 0.40 (95% IC [-0.16, 0.96], p=0.16) y una heterogeneidad baja (I2=0%) (Figura 24) [48, 120]. Adicionalmente, con dos artículos se realizó la comparación para la fracción de LT-CD8 estromales, evidenciando que no hay cambio en el conteo de estas células pre vs pos-NAC (diferencia media de 0.42 (95% CI [-0.15, 0.96], p=0.18) y una heterogeneidad baja (I2=0%)) (Figura 24) [48, 120]. Por último, se hizo un análisis teniendo en cuenta todos los artículos sin diferenciar la localización, donde se corroboró que no hay cambios en este marcador en respuesta a la NAC, con una diferencia media de 0.06 (95% CI [0.22, 0.33], p=0.69) y una heterogeneidad baja (I2=27%) (Figura 24) [50, 55, 120].

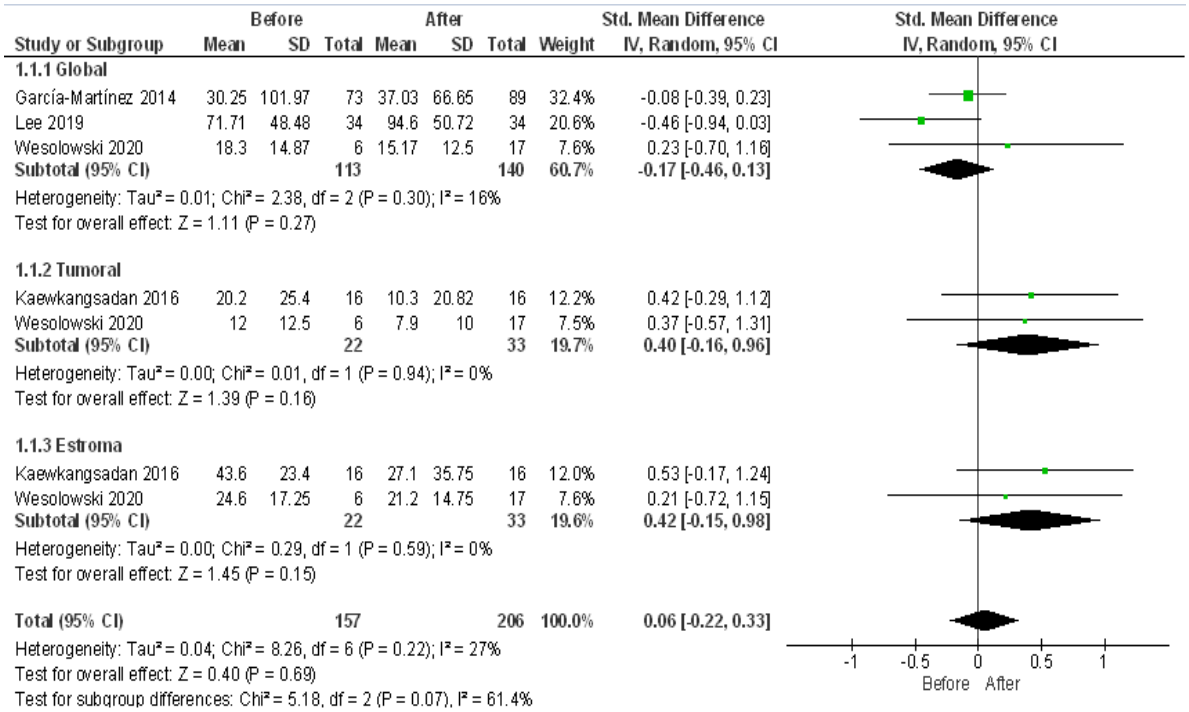

Figura 24. *Meta-análisis conteo de linfocitos T CD8+*. Influencia de NAC en la densidad de LT-CD8+ de tumores BC. Forest plot para los resultados de la densidad de LT-CD8+ antes y después de NAC. El forest plot muestra la SMD (cuadrados) y el intervalo de confianza del 95 % de los estudios individuales. El rombo en cada gráfico indica la estimación general y el intervalo de confianza del 95%.

Para los trabajos de Ladoire, *et al*., (2011) [49] y Wang, *et al*., (2018) [119] los pacientes se agruparon según el grado de infiltración antes de la NAC. En el metaanálisis se encontró que no hubo un cambio significativo en el grado de infiltración en respuesta al tratamiento en el grupo de pacientes con un alta infiltración pre-NAC (diferencia media de -0.03 (95% CI [-0.19, 0.14], p=0.76) y una heterogeneidad baja (I2=56%)) (Figura 25)., ni en los pacientes con baja infiltración pre-NAC (diferencia media de 0.02 (95% CI [-0.16, 0.20], p=0.82) y una heterogeneidad baja (I2=60%)) (Figura 25).. Finalmente, el análisis en conjunto de todos estos grupos de pacientes no mostró cambios significativos en la infiltración pos-NAC (diferencia media de -0.00 (95% CI [-0.11, 0.11], p=0.97) y una heterogeneidad baja (I2=52%) (Figura 25) [49, 119].

CD8

Dos artículos reportaron que no hay una correlación entre el aumento de CD8 pos-NAC con la pCR [88, 91]. Por su parte, Vanguri *et* al., (2022) evidenció una disminución significativa únicamente en pacientes con pCR [51], mientras que Liang reporta un aumento en pacientes no respondedores [112]. Adicionalmente, en dos artículos se reportó una correlación positiva entre la RFS y una alta tasa de cambio en LT-CD8 en respuesta al tratamiento [49, 81].

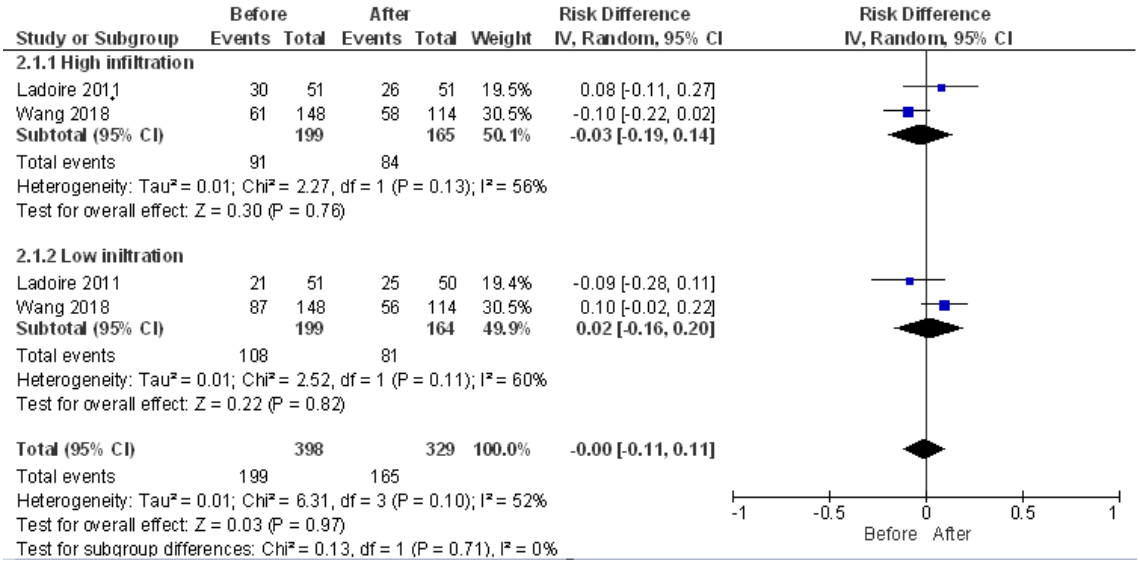

Figura 25. ***Meta-análisis infiltración de linfocitos T CD8+.*** Influencia de NAC en el conteo de LT-CD8+ de tumores cáncer de mama. Forest plot para los resultados del conteo de LT-CD8+ antes y después de NAC. El forest plot muestra la SMD (cuadrados) y el intervalo de confianza del 95 % de los estudios individuales. El rombo en cada gráfico indica la estimación general y el intervalo de confianza del 95%.

FoxP3

10 artículos reportaron una disminución pos-NAC de FoxP3 [47-54, 105, 110], y cinco no reportaron cambios con respecto al tratamiento [46, 55, 81, 106, 116]. Se pudo realizar meta-análisis con cinco artículos, encontrando una disminución significativa en la expresión de este marcador pos-NAC (diferencia media de 0.45 (95% IC 0.05-0.86 P= 0.03) y una heterogeneidad alta (I2=76%)) (Figura 26) [47, 48, 50, 55, 105]

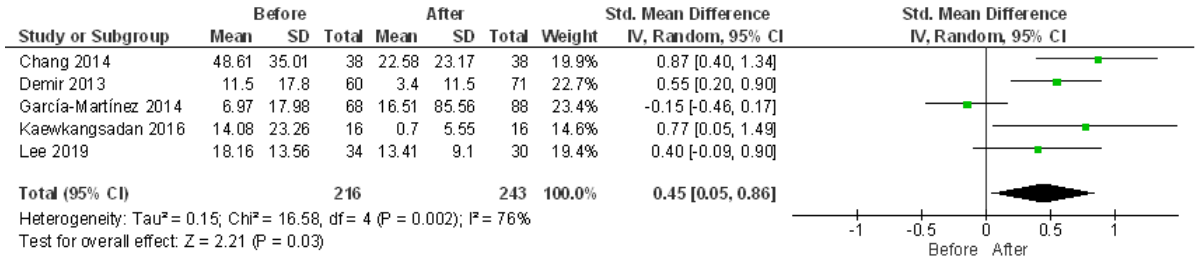

Figura 26. ***Meta-análisis linfocitos FoxP3+.*** Influencia de NAC en la densidad de Foxp3 de tumores BC. Forest plot para los resultados de la densidad de FoxP3 antes y después de NAC. El forest plot muestra la SMD (cuadrados) y el intervalo de confianza del 95 % de los estudios individuales. El rombo en cada gráfico indica la estimación general y el intervalo de confianza del 95%.

Cinco estudios realizaron asociaciones entre el cambio de FoxP3 en respuesta a la NAC con la respuesta clínica de las pacientes. En tres artículos no se encontró relación entre los cambios de infiltrado de FOXP3 y los desenlaces clínicos [55, 81, 105]. En contraste, un artículo evidenció que la disminución de FOXP3 pos-NAC se relaciona con mejor RFS [49] y el último trabajo encontró que los pacientes con menor expresión de FOXP3 tuvieron una mayor tasa de pCR [47].

Radio CD8/FOXP3

De los 32 artículos analizados, cuatro evaluaron el radio CD8/FOXP3. En dos de estos se reportó un aumento [50, 105], mientras que en los otros dos no hubo cambios [49, 81]. Es importante resaltar que solo en uno de los artículos se reportó un valor significativo [105] que en el resto no se reportó el valor-p, por lo cual no se puede hablar de significancia estadística.

Tres de los estudios mencionados hicieron correlaciones con desenlaces clínicos y los cambios en el radio CD8/FOXP3. En el trabajo de Chan, *et al*., (2014) los datos reportados se categorizaron según la respuesta patológica evidenciada, dividiendo la población en un grupo de respondedores y otro de no respondedores. En ambos grupos se encontró un aumento significativo del radio CD8/FOXP3 pos-NAC, siendo mayor el cambio en el grupo de respondedores [105]. Por otra parte, Ladoire, *et al*., (2011) no evidenciaron cambios en el radio CD8/FOXP3 pos-NAC de pacientes con cáncer de mama HER2-, sin embargo, al realizar seguimiento por 5 años para evaluar RFS y OS, identificaron que las pacientes que habían presentado aumento en el radio CD8/FOXP3 pos-NAC tuvieron una mejoría significativa en estos desenlaces clínicos comparado con las pacientes que no presentaron cambios [49]. En el caso de Miyashita, *et al.,* (2015) los datos fueron reportados como el porcentaje de pacientes con aumento del ratio y reportan que un mayor cambio en el radio CD8/FOXP3 después de la NAC se asocia significativamente con una mejor respuesta cínica [81].

Marcadores y citoquinas

Solo 13 de los 32 artículos incluidos en la revisión (40.6%) evaluaron marcadores o citoquinas en el infiltrado tumoral (Tabla 5). El marcador CTLA-4 solo fue evaluado por Kaewkangsadan, *et* al., (2016) y reportó una reducción significativa de su expresión en LT estromales pos-NAC sin cambios en los LT intratumorales [48].

PD-1 fue evaluado en cuatro artículos: Wang, *et* al., (2018) reporta un aumento significativo de la expresión de PD-1 en LT CD8+ estromales[119]. Kaewkangsadan, *et* al., (2016) reporta una reducción tanto de LT PD-1+ intratumorales como estromales [48], mientras que Wesolowski, *et* al., (2020) reporta una reducción en la cantidad de pacientes cuyos tumores fueron positivos para PD-1 total (tumoral y estromal) pos-quimioterapia [120]. Por su parte, Liang, *et* al., (2021) reporta una reducción significativa de PD-1 para las pacientes que alcanzan la pCR pero no de manera general. Al comparar la expresión de PD-1 en subpoblaciones de LT, reporta una disminución de su expresión en LT-CD4 en el grupo de pacientes respondedoras. Por otro lado, la expresión de PD-1 en LT-CD8 aumentó de manera global y también en el grupo de pacientes no respondedoras [112].

PD-L1 fue evaluado en 9 artículos: Lee, *et* al., (2019) reporta un aumento significativo en células estromales, sin cambios en células tumorales [50], mientras que Wesolowski, *et al.,* (2020) reporta una reducción en la cantidad de pacientes cuyos tumores fueron no encontraron diferencias significativas en la expresión de PD-L1 luego de la NAC [46, 48, 54, 108, 114, 115, 119]. Dos artículos evalúan la expresión estromal global de PD-L1 [108, 115], mientras que otro evalúa la expresión en TILs CD8+ estromales [119]. Es interesante que Zhang, *et al*., (2019) utiliza un *score de positividad combinado*, el cual evalúa el número de células tumorales, linfocitos y macrófagos positivos para PD-L1 sobre el total de células tumorales, encontrando una reducción de PD-L1 luego de la NAC la cual no se encuentra al compararlo directamente [54].

LAG-3 fue evaluado en dos estudios, Sarradin, *et al*., (2021) reportó una disminución significativa de la expresión estromal de LAG-3 luego de la quimioterapia [115]. Por su parte, Wang, *et al*., (2018) evalúa la expresión de LAG-3 en TILs CD8+ y reporta un aumento de su expresión en el grupo de pacientes que no tuvieron respuesta favorable a la NAC [119].

Artículo	**Checkpoints y citoquinas**
Abdelrahman, 2021 [46]	**PD-L1 = NS-p**
Graeser, 2021 [107]	Estroma PD1 en CD4 **= NS-p** PD1 en CD8 **⇧**** PD-L1 **= NS-p** Tumor PD1 en CD4 **= NS-p**

	PD1 en CD8 ⇧*** PD-L1 ⇧**
Grecco-Hoffmann, 2021 [108]	PD-L1 = NS-p
Kaewkangsadan, 2016 [48]	PD-L1 = NS-p CTLA-4 estromal ⇩* CTLA-4 tumoral = NS-p PD-1 estromal ⇩** PD-1 tumoral ⇩** IL-1 = NS-p IL-2 = NS-p IL-4 ⇩** IL-10 = NS-p IL-17 = NS-p IFN-y = NS-p TGF-B = NS-p
Lee, 2019 [50]	PD-L1 estromal ⇧*** PD-L1 tumoral =NS-p
Liang, 2021 [112]	PD-1 =NS-p TIM3 =NS-p CD8 PD1 ⇧* CD4 PD1 =NS-p CD8 TIM3 =NS-p CD4 TIM3 =NS-p
Naofumi Oda, 2012 [52]	IL-17F =NR-p
Pelekanou, 2018 [114]	PD-L1 = NS-p
Sarradin, 2021 [115]	PD-L1 =NS-p TIM3 ⇧*** LAG3 ⇩*
Verma, 2015 [118]	TGFb = NR-p IFNg = NR-p IL-2 = NR-p
Wang, 2018 [119]	PD-L1 = NS-p PD-1 ⇧* LAG-3 ⇧*
Wesolowski, 2020 [120]	Overall PD-L1 = NR-p Stromal PD-L1 = NR-p Intratumoral PD-L1 = NR-p Overall PD-1 = NR-p
Zhang, 2019 [54]	PD-L1 CPS ⇩** PD-L1 células tumorales = NR-p PD-L1 TILS = NR-p
* p0.05, **p0.01, ***p0.001; NS-p: Valor P no significativo; NR-p: Valor P no reportado	

Tabla 5. *Tabla de tendencias de checkpoints y de citoquinas*

Por otro lado, dos artículos evaluaron TIM3 pre y pos-NAC. Uno de ellos no reportó un aumento estromal significativo luego de la NAC [115], mientras el otro reportó una disminución significativa en las pacientes con una peor respuesta clínica, pero no hubo cambios significativos al evaluarlo de manera general entre las pacientes del estudio [112].

Kaewkangsadan, *et al*., (2016), Verma, *et al*., (2015) y Naofumi Oda, *et al*., (2012) evaluaron el efecto de la NAC en la expresión *in-situ* de varias citoquinas. Únicamente la IL-4 disminuyó significativamente después de la quimioterapia [48] Por otro lado, no se encontraron cambios en la expresión de IL-2, IFN-y, IL-1, TGF-B, IL-10 o IL-17 después de la NAC [48, 52, 118].

Cuatro de los artículos mencionados anteriormente relacionaron el cambio de PD-L1 luego de la NAC con la respuesta clínica. Wang, *et al*., (2018) reportó una asociación negativa entre el aumento de PD-L1 luego de la NAC y la pCR [119]. Por el contrario, Waks, *et al*., (2019) observó que un aumento en PD-L1 tumoral y estromal es de buen pronóstico [53]. Adicionalmente, Lee, *et al*., (2019) encontró que la ausencia de PD-L1 o la conversión negativa de la expresión de PD-L1 tumoral durante la NAC, se asocia con un peor pronóstico [50]. Por su parte Pelekanou, *et al*., (2018) no encontró una correlación entre el cambio de la expresión de PD-L1 en relación a la NAC [114]. Únicamente Wang, *et al*., (2018) reportó una correlación negativa entre la expresión de LAG-3 y la pCR, adicionalmente cuando aumentó en conjunto la expresión de PD-L1 y de LAG-3 las pacientes exhibieron un peor pronóstico [119].

Verma, *et* al., (2015) y Naofumi Oda, *et al*., (2012) evaluaron TGF-b e IL-17F respectivamente en relación con la pCR. TGFβ tiende a aumentar, aunque no significativamente luego de la NAC en los pacientes cuyos tumores no tuvieron pCR [118]. Por otro lado, la tasa de pCR no se modificó según el grado de expresión de IL-17F en el infiltrado tumoral luego de la NAC [52].

Artículos que evaluaron cambio en el infiltrado después de un ciclo de NAC

Cuatro artículos midieron el cambio de marcadores celulares o moleculares antes y después de un solo ciclo de quimioterapia neoadyuvante. Dos de ellos reportaron un aumento de TILs significativo entre las muestras de pre y después de un ciclo [50, 97]. Lee, *et al*., (2019), no encontró asociaciones con variables clinicopatológicas significativas [50]. Graeser, *et al*., (2021)

y Lee, *et al*., (2019) evaluaron las poblaciones de LT CD4+ y LT CD8+ tanto en estroma como en tejido tumoral y reportaron un aumento significativo después del primer ciclo de NAC en ambas poblaciones [50, 107]. Adicional a esto, Lee, *et al*., (2019) cuantificó la población de los Tregs mediante la expresión de FOXP3 en donde encontraron una disminución significativa de estos después de un ciclo de NAC; y midieron el radio de CD8/FOXP3 del cual reportaron un aumento [50]. Graeser, *et al*., (2021), además de esto, midió LT totales, PD1 en CD4 y CD8; y PD-L1 en células estromales y tumorales. La población de LT exhibió un aumento significativo. En cuanto a PD1 en CD4 y CD8 encontró un aumento significativo de su expresión en LT CD8+, a diferencia de LT-CD4+ que no demuestra una diferencia significativa. Con relación a PD-L1 se reportó un aumento significativo de su expresión en tejido tumoral, no obstante, no se evidenció cambio significativo en el estroma [107]. Por su parte, Varadan, *et al*., (2016) realizó una medición del “Immune index” que se define como una firma inmunológica dada a partir de la expresión de un grupo de genes, encontrando que no hay un cambio significativo después del primer ciclo de la NAC [117].

7.2.2. Caracterización del infiltrado inmune por medio de ISSLU

Para evaluar el efecto de la NAC en el infiltrado inmune tumoral, invitamos a pacientes con cáncer de mama del servicio de oncología clínica del Instituto Nacional de Cancerología a participar en un estudio descriptivo, las pacientes que accedieron a participar, firmaron un consentimiento informado y nos dieron acceso a las muestras de patología de su tumor, antes (biopsia) y después (espécimen quirúrgico), y a los datos de su desenlace clínico consignado en la historia clínica. Todos los datos personales y de identificación fueron tratados de manera confidencial para reservar la identidad de las participantes.

Las láminas de H&E de las pacientes fueron revisadas con el acompañamiento de un residente en patología, para evaluar en cuales bloques quedaba tejido tumoral después del tratamiento neoadyuvante. Se seleccionaron entre uno y tres bloques por paciente, y se realizaron cortes de estos bloques en el laboratorio de Patología Interfacultades de la Facultad de Medicina.

Las láminas de la biopsia y de las cirugías fueron desparafinadas y marcadas con los 6 anticuerpos previamente estandarizados (CD45, CD68, CD20, CD3, CD8 y Pankeratinas). Se tomaron fotos en los hotspots de marcación y se puntearon siguiendo la metodología utilizada por Matkowski, *et al*., (2009), donde proponen evaluar, la cantidad de células positivas y la intensidad de la marcación, adicional a la localización del infiltrado inmune con respecto a las células tumorales: central o periférico y la distribución de las poblaciones: formando agregados nodulares o si por el contrario se encuentran de forma difusa en el microambiente [122].

Graficamos los puntajes de la cantidad y la intensidad de la marcación, y encontramos una diferencia estadísticamente significativa en la infiltración leucocitaria total evaluada por CD45, la cual aumenta después del tratamiento neoadyuvante (Figura 27). Sin embargo, en el resto de las poblaciones inmunes evaluadas con los marcadores CD68 (Figura 28), CD20 (Figura 29), CD3 (Figura 30) y CD8 (Figura 31) no encontramos diferencias significativas antes y después de la NAC. Adicionalmente, realizamos las sobreposiciones de las imágenes tomadas de las marcaciones secuenciales. Para esto, seguimos la metodología propuesta en [23], sin embargo, al no contar con un digitalizador automatizado de láminas, se tomaron fotos de manera manual teniendo en cuenta las coordenadas donde se habían tomado fotos de las coordenadas anteriores, así es como logramos realizar las sobreposiciones de las diferentes marcaciones (Figuras 32 y 33).

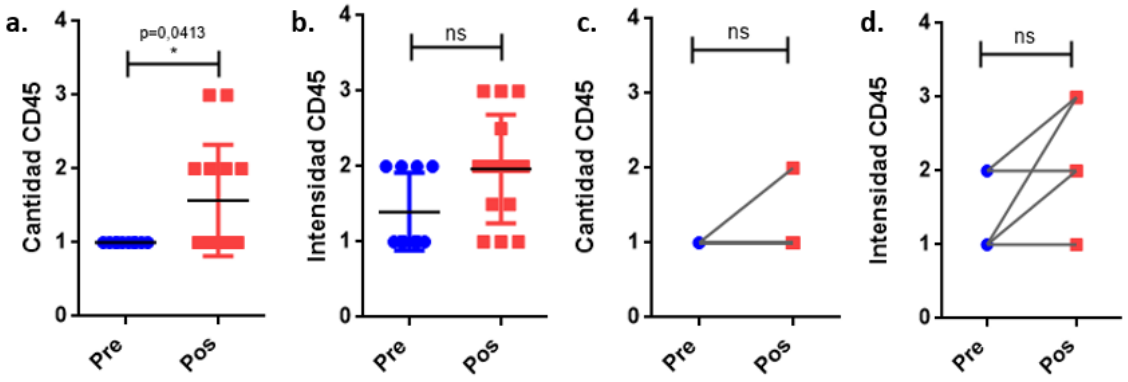

Figura 27. ***Semi-cuantificación de la infiltración de CD45.*** Análisis de grupos de la a. Cantidad y b. Intensidad de la marcación (Mann-Whitney). Análisis pareados de la c. Cantidad y d. Intensidad (Wilcoxon test).

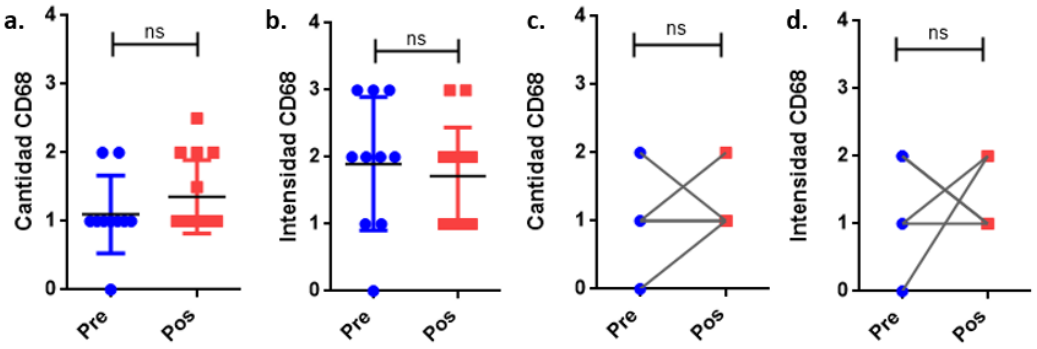

Figura 28. ***Semi-cuantificación de la infiltración de CD68.*** Análisis de grupos de la a. Cantidad y b. Intensidad de la marcación (Mann-Whitney). Análisis pareados de la c. Cantidad y b. Intensidad (Wilcoxon test).

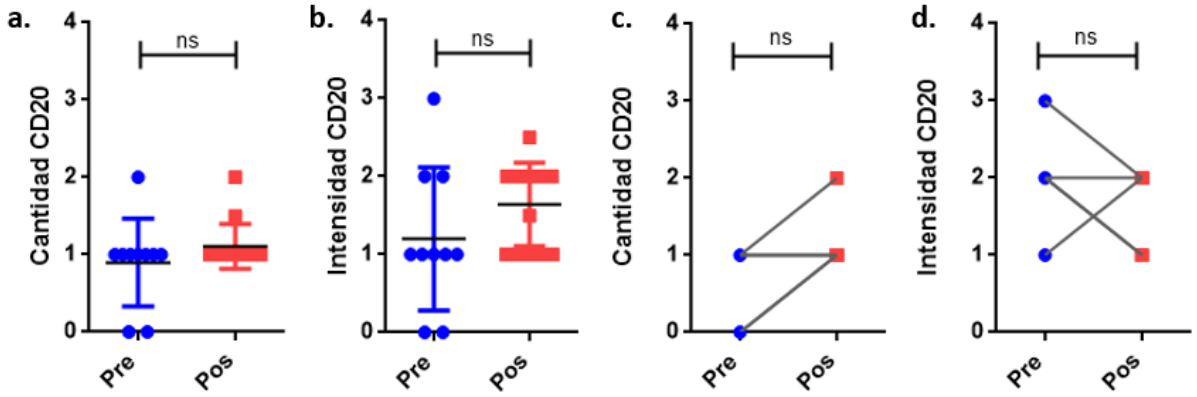

Figura 29. ***Semi-cuantificación de la infiltración de CD20.*** Análisis de grupos de la a. Cantidad y b. Intensidad de la marcación (Mann-Whitney). Análisis pareados de la c. Cantidad y b. Intensidad (Wilcoxon test).

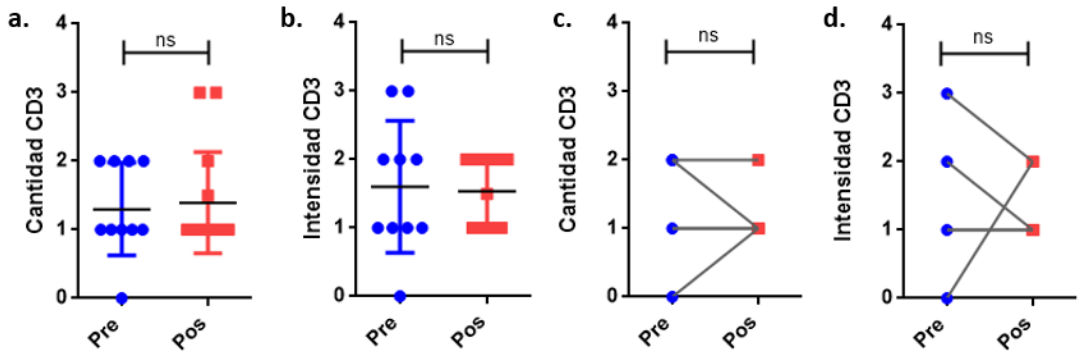

Figura 30. ***Semi-cuantificación de la infiltración de CD3.*** Análisis de grupos de la a. Cantidad y b. Intensidad de la marcación (Mann-Whitney). Análisis pareados de la c. Cantidad y b. Intensidad (Wilcoxon test).

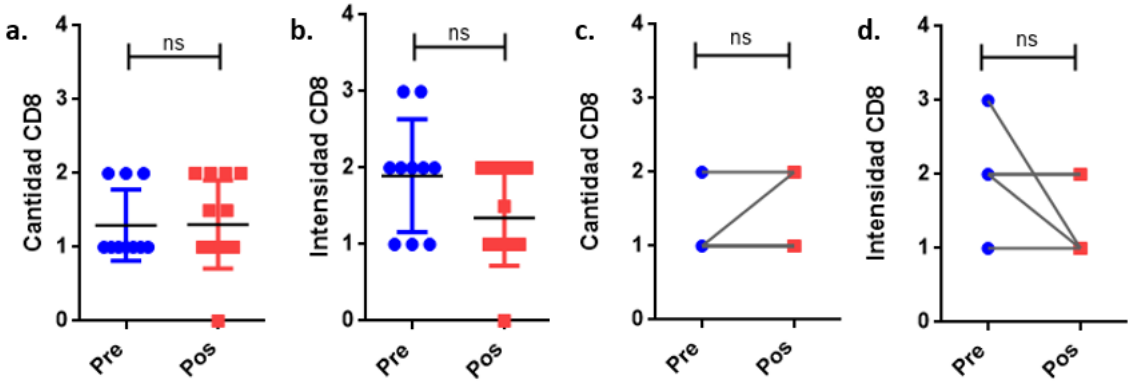

Figura 31. ***Semi-cuantificación de la infiltración de CD8.*** Análisis de grupos de la a. Cantidad y b. Intensidad de la marcación (Mann-Whitney). Análisis pareados de la c. Cantidad y b. Intensidad (Wilcoxon test).

En el anexo 5 se encuentran las sobreposiciones de algunas muestras de biopsias y mastectomías. De manera general observamos un patrón de infiltración de los LT-CD3 y CD8 periférico, mientras los LB y Mϕ si infiltraban intratumoralmente. Sin embargo no es posible sacar conclusiones definitivas pues no en todas las muestras encontramos este patrón. Dentro de la evaluación de las láminas marcadas se tuvo en cuenta la distribución y la formación de estructuras nodulares.

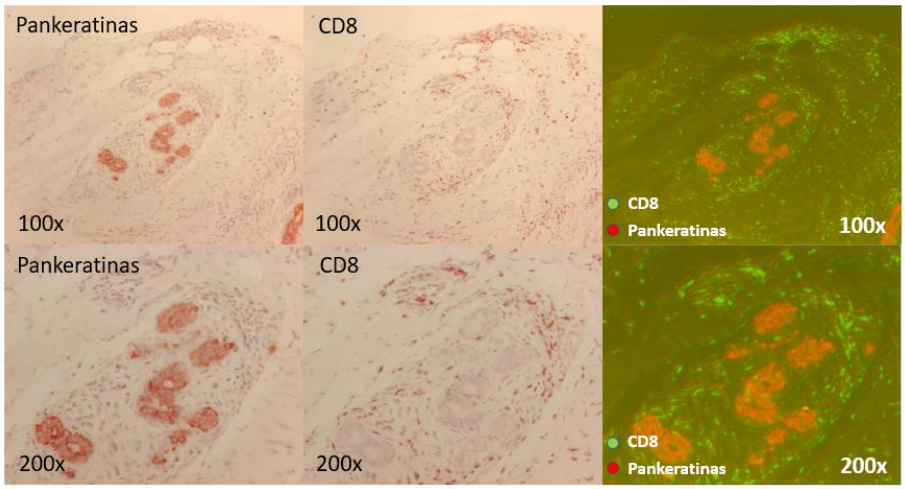

Figura 32. ***Sobreposición de marcaciones.*** Aumento de 100X y 200X de una biopsia marcada con los anticuerpos anti-CD8 y anti-Pankeratinas. Sobreposición de ambas marcaciones.

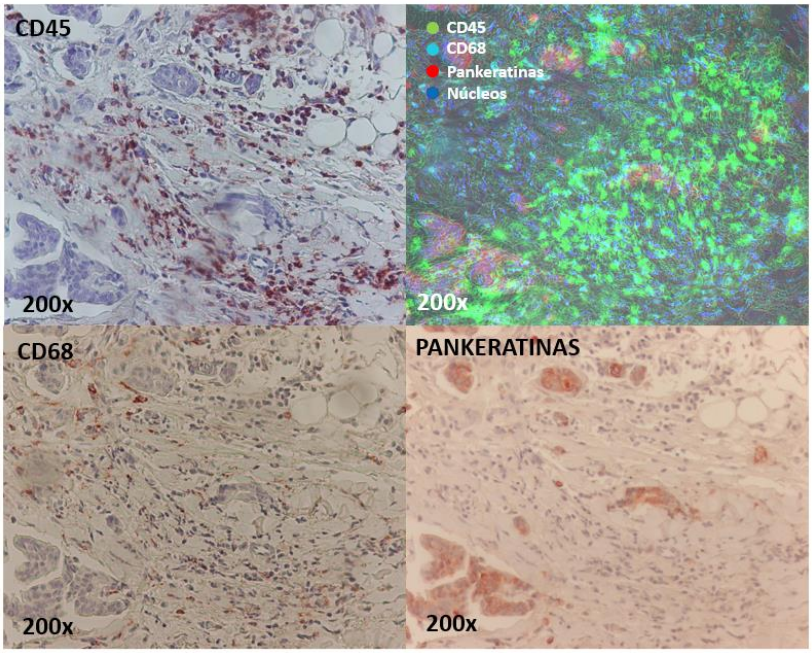

Figura 33. ***Sobreposición de marcaciones***. Aumento de 200X de una biopsia marcada con los anticuerpos anti-CD45, anti-CD68 y anti-Pankeratinas. Sobreposición de las tres marcaciones.

Como se mencionó previamente al ser fotografías tomadas de manera manual, la mayoría de las veces no quedan en el punto exacto para que la sobreposición y colocalización de las proteínas se vea exacta, por lo cual la resolución de las sobreposiciones no tiene una buena resolución. Sin embargo, creemos que esta técnica resulta ser costo-efectiva para mapear el microambiente tumoral, pues permite evaluar las diferentes poblaciones sobre la misma lámina y de esta forma

estudiar la formación de estructuras linfoides terciarias y el agrupamiento de diferentes subtipos inmunes (Anexo. 5)

7.2.3. Caracterización de las poblaciones inmunes evaluadas por CIBERSORTx

Por último, con la intención de tener una aproximación más cuantitativa del infiltrado inmune tumoral antes y después de la NAC, tomamos los datos de secuenciación de mRNA publicados por Hee Park, *et al*., (2021), quienes secuenciaron el transcriptoma tumoral de 112 pacientes antes de la NAC (pre), 88 después de un ciclo de NAC (1 ciclo) y 27 al momento de la cirugía (pos). Estos transcriptomas estaban normalizados en TPMs, por lo cual pudieron ser analizados en el software de uso libre CIBERSORTx, el cual utiliza una matriz de perfiles transcripcionales de 22 subtipos inmunes y cuantifica las fracciones relativas dentro del transcriptoma tumoral [25, 26]. Al igual que con los datos de los puntajes de las marcaciones de IHQ, hicimos análisis pareados (Wilcoxon) y análisis de grupo (Kruskal-Wallis).

Para las fracciones del linaje de células B, encontramos una disminución significativa en los LB-naive pos-NAC, en comparación con la muestra pre, sin embargo, al momento de hacer el análisis grupal no vimos diferencias entre los tres puntos de tiempo (Figura 34. a y d). Evaluando la fracción de LB de memoria también vimos una disminución en el momento de la cirugía en

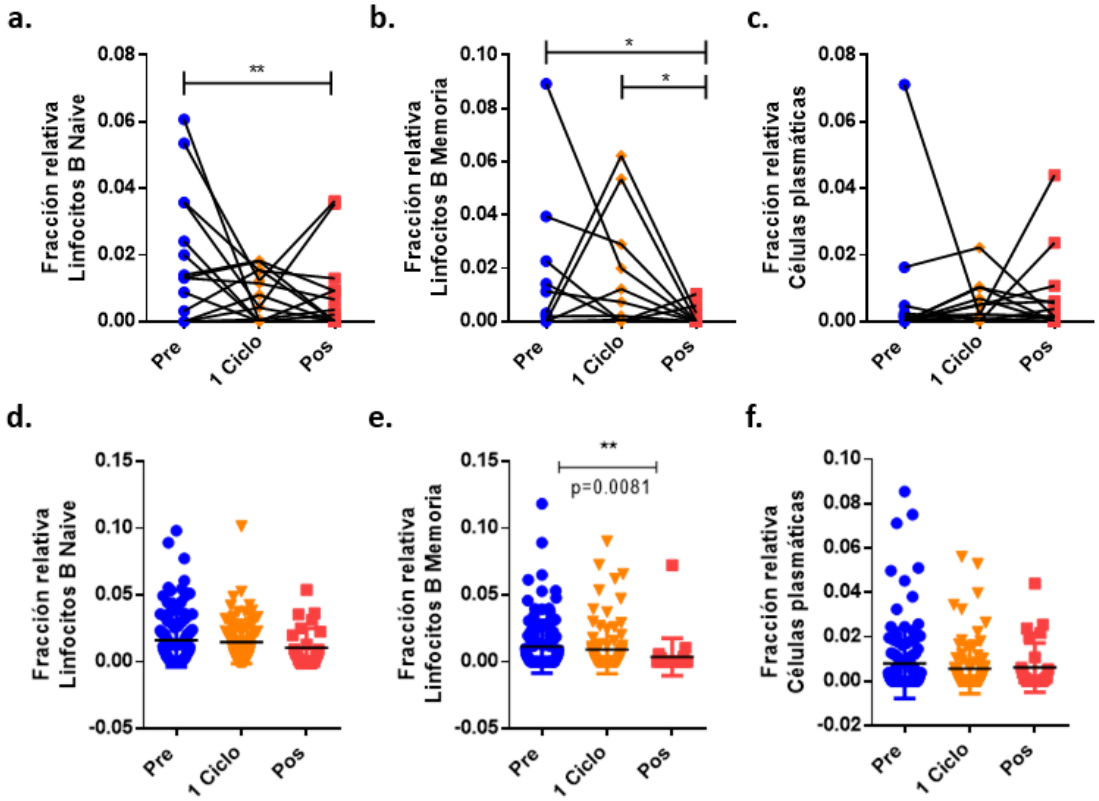

Figura 34 ***Fracciones relativas a LB.*** Fracciones relativas evaluadas por CIBERSORTx para las poblaciones de LB-Naive, LB-Memoria y Células plasmáticas. Los análisis pareados se hicieron con la prueba Wilcoxon (a, b y c) y los análisis de grupo se hicieron con la prueba Kruskal Wallis (d, e y f).

comparación con la muestra pre-NAC y después de un solo ciclo, diferencias que se mantuvieron al momento del análisis grupal (Figura 34. b y e). Por último, para la fracción relativa de células plasmáticas no vimos diferencias significativas entre los tres puntos de tiempo (Figura 34. c y f).

Para la fracción relativa de LT-CD8 y de LT-CD4 quiescentes encontramos una diferencia significativa a nivel grupal (Figura 35 d y e). Ambas poblaciones aumentan su expresión después de ciclo de NAC, y disminuyen al momento de la cirugía, sugiriendo un aumento de la infiltración en la respuesta temprana a la NAC. Este comportamiento no se pudo observar en las muestras pareadas (Figura 35 a y b). Por su parte no encontramos diferencias significativas en ningún análisis para la fracción relativa de LT-CD4 activados (Figura 35 c y f).

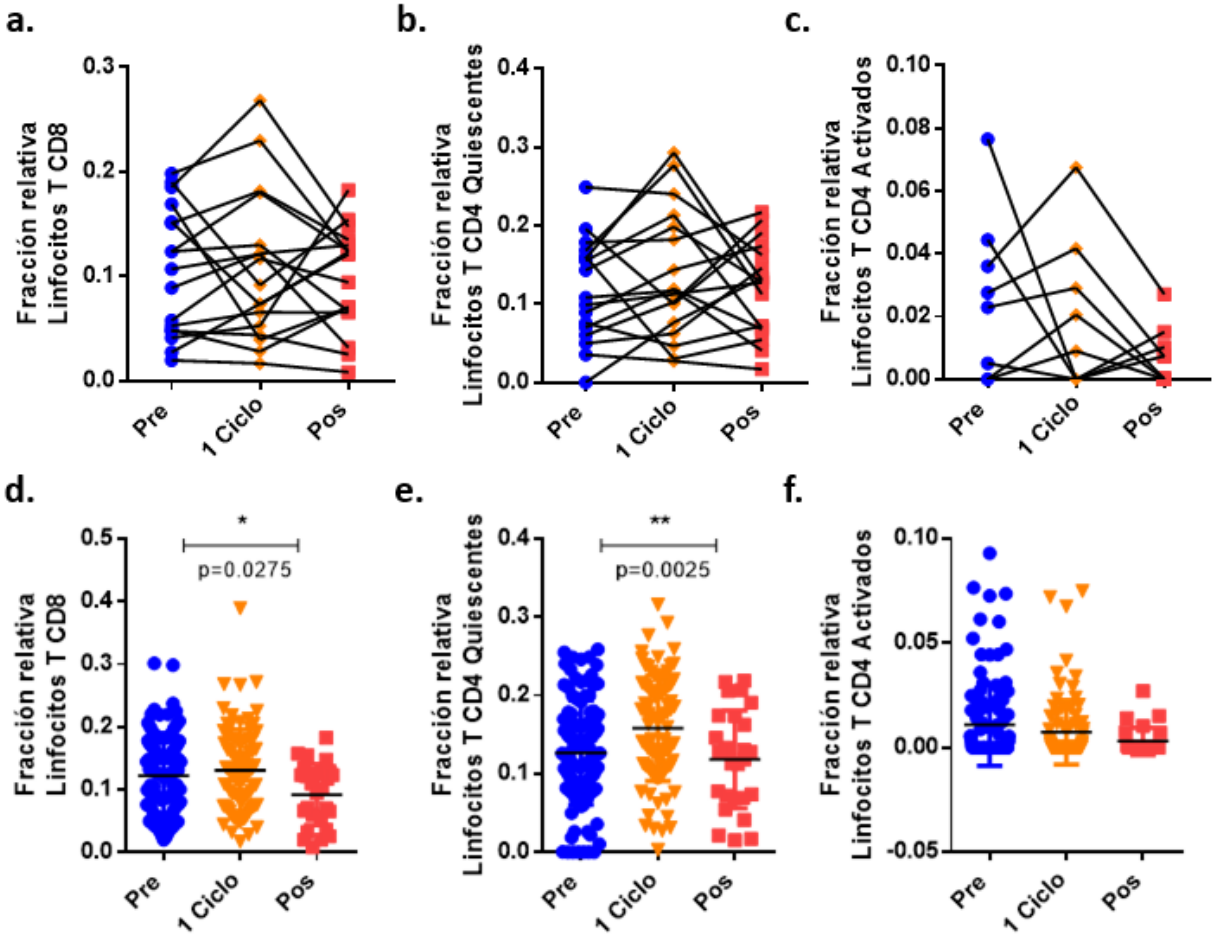

Figura 35. ***Fracciones relativas a LT.*** Fracciones relativas evaluadas por CIBERSORTx para las poblaciones de LT-CD8, LT-CD4 quiescentes y LT-CD4 activados. Los análisis pareados se hicieron con la prueba Wilcoxon (a, b y c) y los análisis de grupo se hicieron con la prueba Kruskal Wallis (d, e y f).

Para las subpoblaciones de LT, a nivel de grupo encontramos una disminución después de un ciclo, que se mantiene hasta el final del tratamiento de la población de LT foliculares, sin embargo, este comportamiento no se observó en las muestras pareadas (Figura 36 a y d). Por otra parte, para la población de Tregs encontramos un aumento significativo después de un ciclo de NAC, con respecto al final del tratamiento. Y también vemos una disminución significativa de esta población al final del tratamiento con respecto a la muestra pre-NAC. Estas diferencias las vemos tanto a nivel pareado, como en el análisis grupal (Figura 36. b y e). Para las fracciones relativas de LTγδ no encontramos ninguna diferencia entre los puntos de tiempo ni en el análisis pareado, ni a nivel de grupo (Figura 36. c y f)

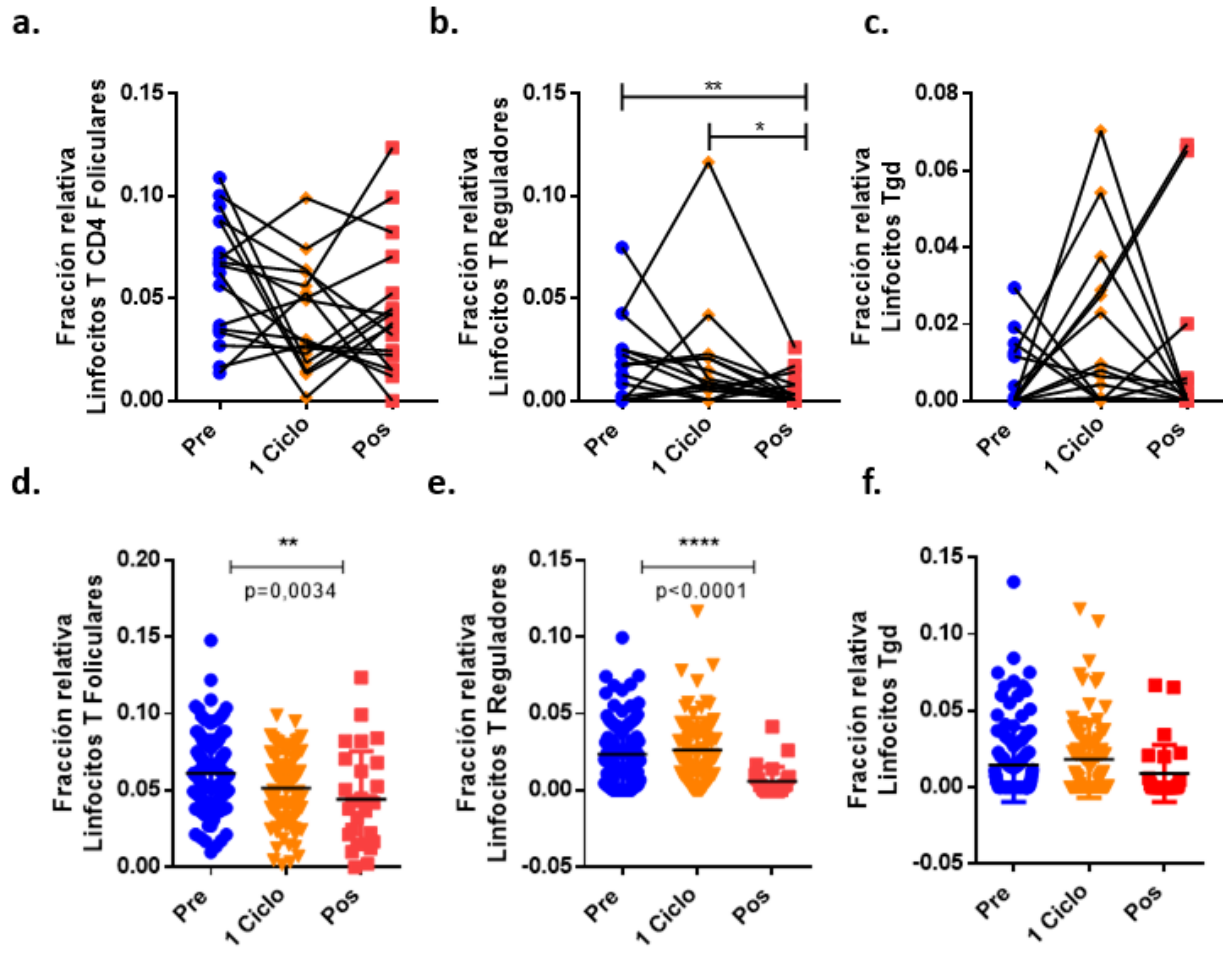

Figura 36. ***Fracciones relativas a subpoblaciones de LT***. Fracciones relativas evaluadas por CIBERSORTx para las poblaciones de LT foliculares, Tregs y LTγδ. Los análisis pareados (a, b y c) se hicieron con la prueba Wilcoxon y los análisis de grupo se hicieron con la prueba Kruskal-Wallis (d, e y f).

Comparamos también las fracciones relativas de células NK activadas, las cuales no cambiaron significativamente ni en el análisis pareado, ni en el análisis de grupo (Figura 37. a y d). En la fracción relativa de la población de monocitos vimos un aumento significativo en el momento de

la cirugía en el análisis pareado (Figura 37. b), pero no en el análisis grupal (Figura 37 e). A diferencia de las células dendríticas activadas que aumentan significativamente en el momento de la cirugía a nivel grupal (Figura 37 f), pero no en el análisis pareado (Figura 37. C).

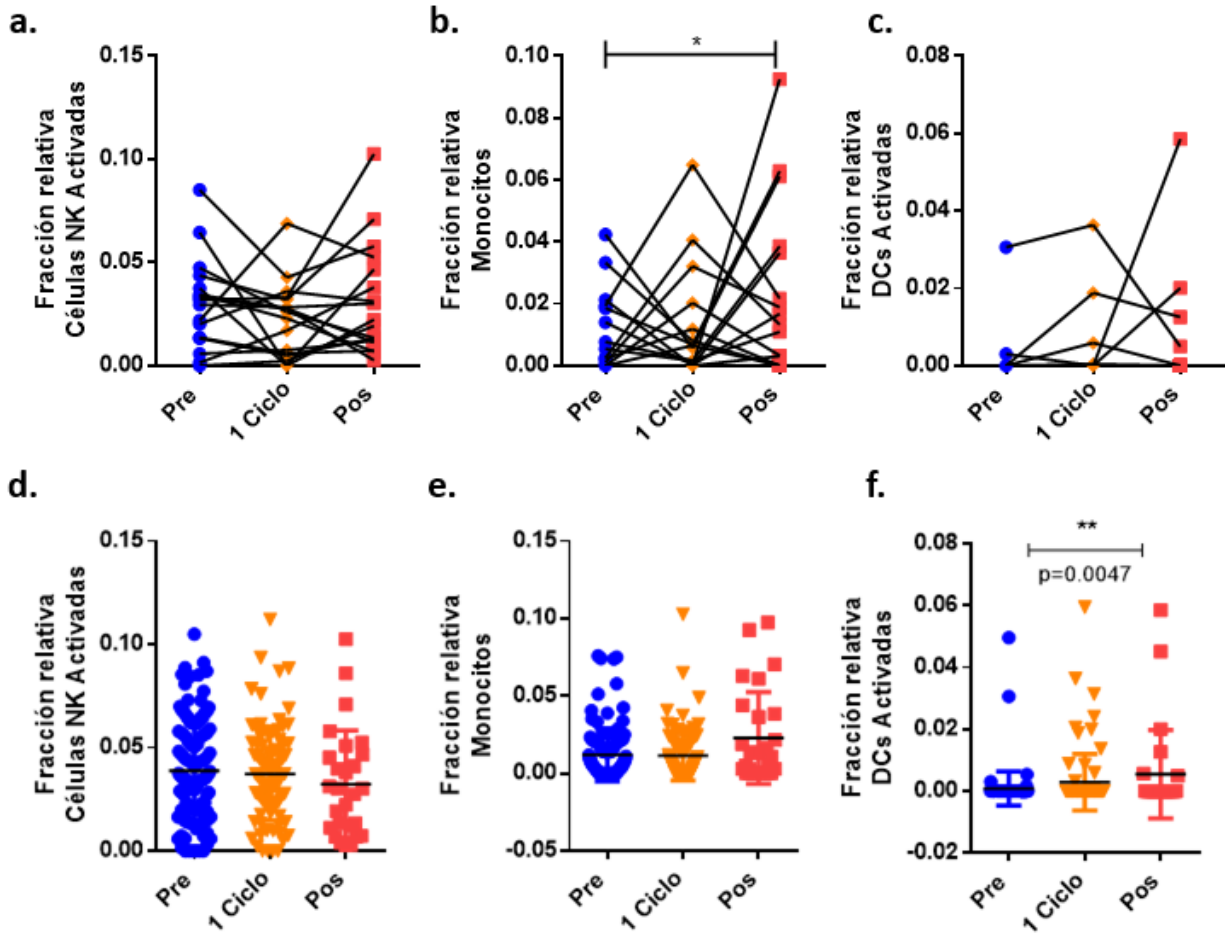

Figura 37. ***Fracciones relativas de NKs, Monocitos y DCs***. Fracciones relativas evaluadas por CIBERSORTx para las poblaciones de NK activadas, Monocitos y DCs activadas. Los análisis pareados (a, b y c) se hicieron con la prueba Wilcoxon y los análisis de grupo se hicieron con la prueba Kruskal-Wallis (d, e y f).

Adicionalmente evaluamos las poblaciones de Mϕ con sus posibles fenotipos M0, M1 y M2. Para los Mϕ-M0 no vimos ningún cambio significativo ni en las muestras pareadas ni a nivel de grupos (Figura 38. a y d). Para los Mϕ-M1 observamos una disminución significativa después de un ciclo de NAC, que se disminuyó también en el momento de la cirugía (Figura 38. b y e). Para la subpoblación de Mϕ-M2 vimos el comportamiento contrario, pero únicamente a nivel de grupos, donde la fracción relativa de esta población aumentó significativamente después de un ciclo de NAC, y después de la cirugía, aunque este comportamiento no se vio en las muestras pareadas (Figura 38. c y f).

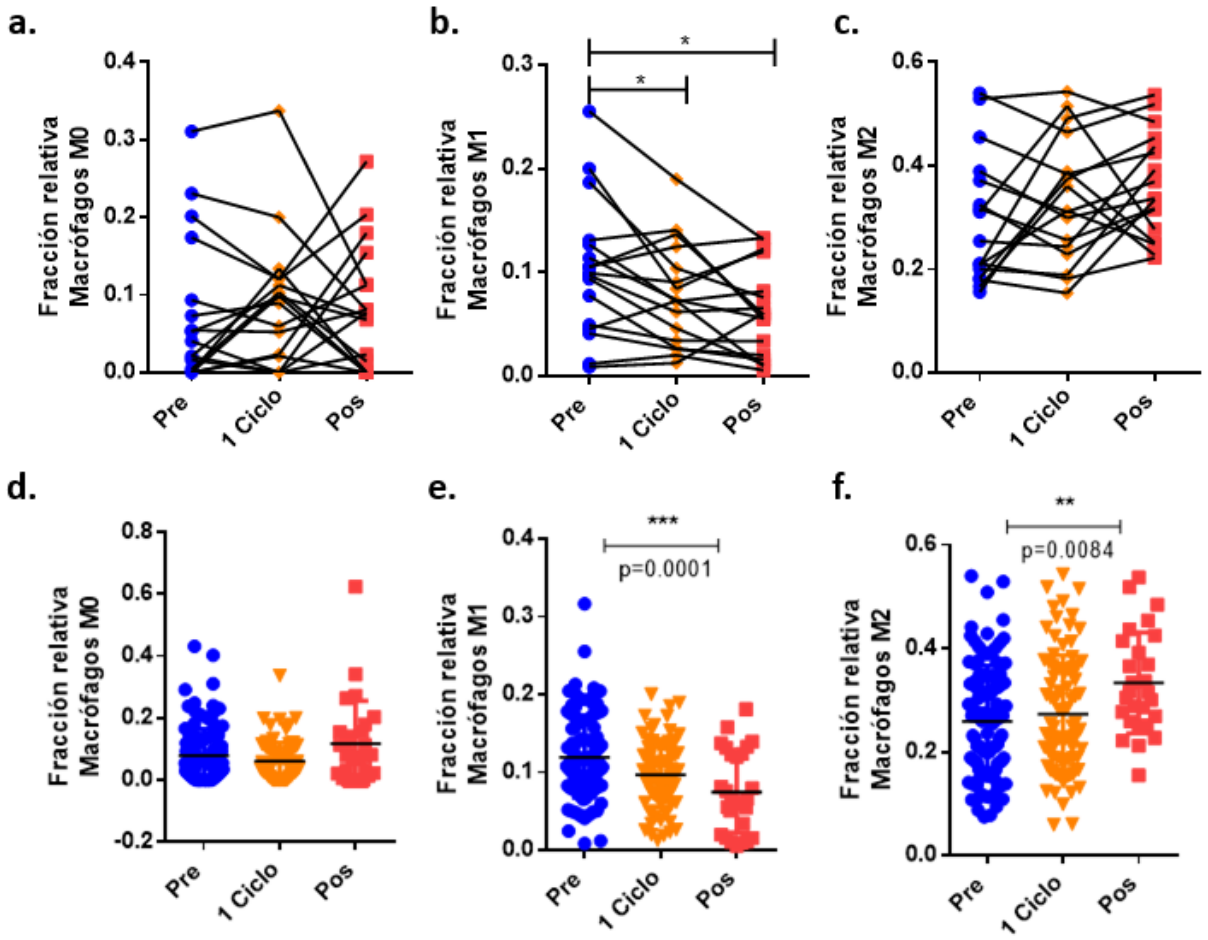

Figura 38. ***Fracciones relativos de las subpoblaciones de Mφ.*** Fracciones relativas evaluadas por CIBERSORTx para las poblaciones de Mϕ-M0/M1/M2. Los análisis pareados (a, b y c) se hicieron con la prueba Wilcoxon y los análisis de grupo se hicieron con la prueba Kruskal-Wallis (d, e y f).

Por último, la tabla de perfiles transcripcionales LM22 (CIBERSORTx), también nos permitió evaluar la fracción de Mastocitos quiescentes y activados y la fracción de neutrófilos (Figura 39). Únicamente vimos diferencias significativas para la población de mastocitos activados, los cuales aumenta significativamente después del tratamiento NAC, en comparación con la muestra pre-NAC y después de un ciclo (Figura 39 b y e), esta diferencia se pudo evidenciar con el análisis pareado y a nivel del análisis grupal.

Esta técnica de análisis transcripcional nos permitió evaluar diferentes subpoblaciones del sistema inmune, haciendo análisis cuantitativos que mostraron el cambio de estas en respuesta al tratamiento con la NAC.

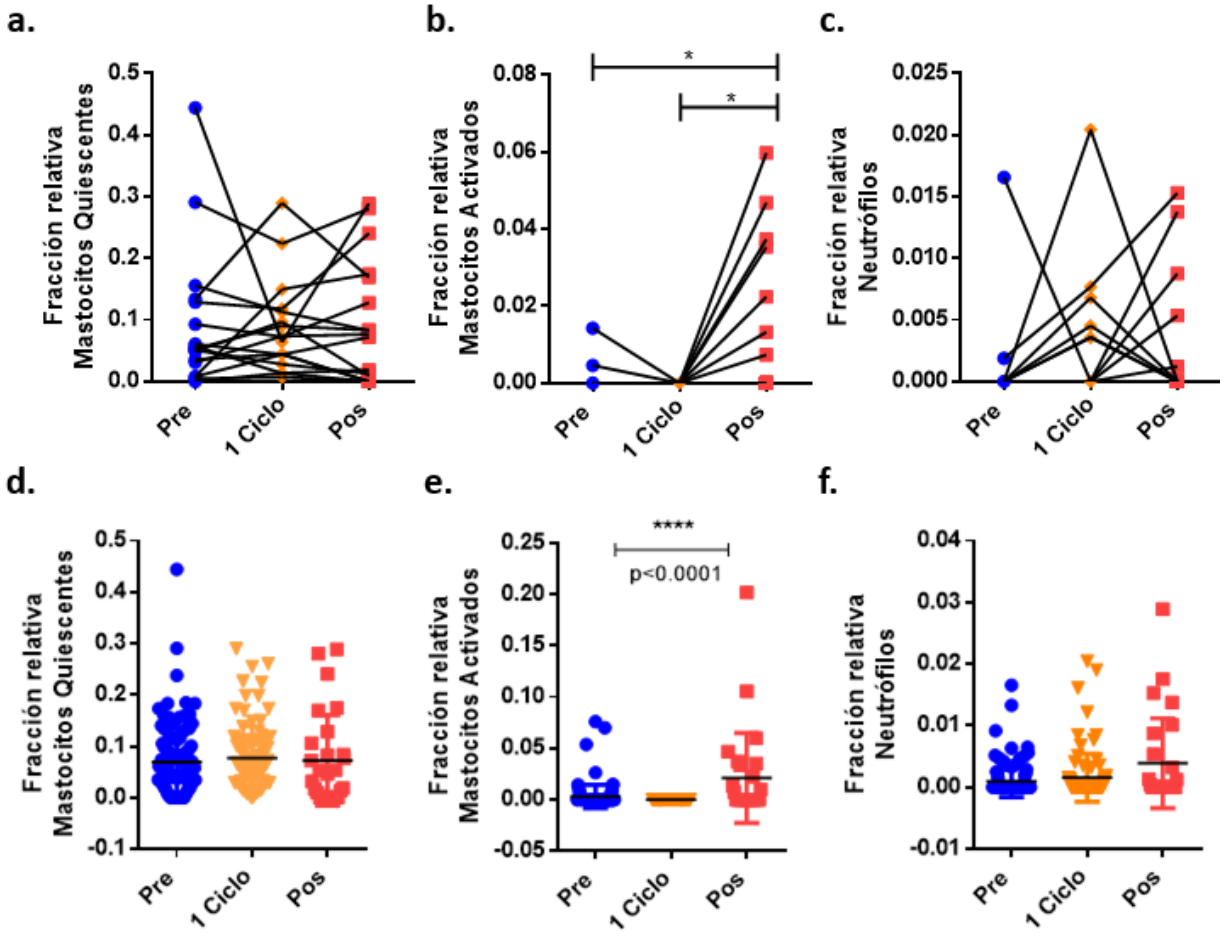

Figura 39. ***Fracciones relativas de mastocitos y neutrófilos.*** Fracciones relativas evaluadas por CIBERSORTx para las poblaciones de Mϕ-M0/M1/M2. Los análisis pareados (a, b y c) se hicieron con la prueba Wilcoxon y los análisis de grupo se hicieron con la prueba Kruskal-Wallis (d, e y f).

7.3. Capítulo 3. Correlaciones entre el desenlace clínico y la evaluación de las poblaciones infiltrantes pre y pos-NAC por medio de la ISSLU

Los estudios del infiltrado inmune tumoral adquieren relevancia en la medida que el comportamiento de una población determinada se convierte en biomarcador pronóstico. Las diferentes poblaciones inmunes pueden ser de buen o mal pronóstico dependiendo del tipo de tumor estudiado [2]. Por este motivo, quisimos evaluar si en nuestra cohorte de pacientes, existe algún tipo de correlación entre las poblaciones de leucocitos, Mϕ, LB, LT y LT-CD8+, evaluadas pre- y pos-quimioterapia y el desenlace clínico de las pacientes. Para esto, organizamos una tabla de las variables clínicas disponibles de cada paciente y las poblaciones medidas por ISSLU pre y pos-NAC.

En cuanto a los subtipos moleculares, el 40% de las pacientes fueron diagnosticadas con tumores de cáncer de mama del subtipo Luminal B, el 20% con el subtipo Luminal A, el 30% con el subtipo HER2-Like y solo el 10% al subtipo triple-negativo (Figura 40 a). Con respecto al estadio de diagnóstico, el 40% de las pacientes fueron diagnosticadas en estadio IIB, el 30% en estadio IIA, el 20% en estadio IIIB y el 10% en estadio IIIA (Figura 40 b), ninguna de las pacientes tuvo metástasis, pero el 50% tenía nódulos positivos (Tabla 6). El 90% de las pacientes tuvieron respuesta parcial (RP) y solo una paciente correspondiente al 10% presento enfermedad estable (EE), resulta de interés que está paciente que no redujo el tamaño tumoral, corresponde a un caso de cáncer de mama triple negativo, el cual se sabe es el subtipo con peor pronóstico (Tabla 6) [123].

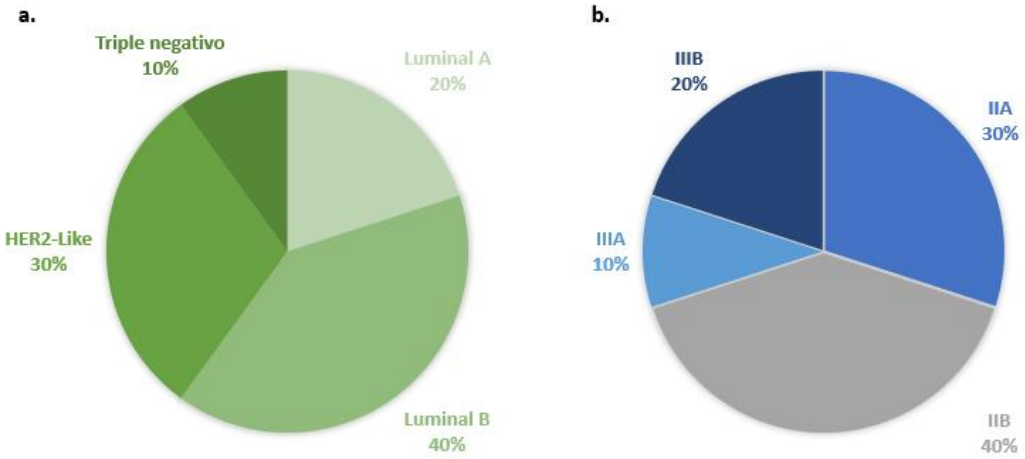

Figura 40. ***Subtipo moleculares y estadio de diagnóstico*.** Porcentaje de pacientes correspondientes a: **a.** los cuatro subtipos moleculares y b. estadio de diagnóstico, incluidas en la cohorte del Instituto Nacional de Cancerología.

Código	Tipo de muestra	Vol. Tumor mm2 pre	EDAD	ER	PR	HER2	Ki67	estadio	TNM	Respuesta clínica
PGT-001	Pre y pos	210	43	80	70	0	40	IIA	T2N0M0	RP
HGV-002	Pos	44	63	100	90	+++	31	IIA	T2N0M0	RP
CRF-003	Pre y pos	700	55	60	60	+++	15	IIB	T3N0M0	RP
AQT-004	Pre	300	66	0	0	+++	40	IIA	T2N0M0	RP
NRG-005	Pre y pos	3250	63	100	10	0	20	IIIA	T4N1M0	RP
MTG-006	Pre	700	43	60	100	0	5	IIB	T3N0M0	RP
MMG-007	Pre	1710	84	0	0	0	70	IIIB	T4N1M0	EE
BTC-008	Pre y pos	2665	73	100	90	0	70	IIIB	T4N1M0	RP
LPP-009	Pre y pos	300	62	100	20	0	10	IIB	T2N1M0	RP
GRN-010	Pos	215	57	100	80	0	40	IIB	T2N1M0	RP

Tabla 6. ***Desenlace clínico***. Variables clínicas antes y después de la NAC de las pacientes del INC incluidas en el estudio.

Adicionalmente, encontramos una tendencia a una disminución del tamaño tumoral en respuesta a la NAC (Figura 41), la cual concuerda con resultados previos del grupo de Inmunología y Medicina Traslacional [21, 22], aunque en la presente cohorte no encontramos diferencias estadísticamente significativas.

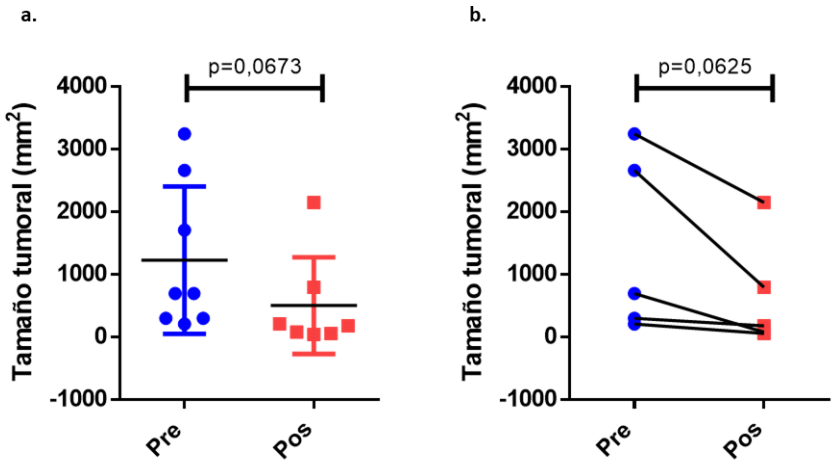

Figura 41. ***Reducción del tamaño tumoral.*** Evaluación del tamaño tumoral al momento de la biopsia (pre) y de la cirugía (pos). a. análisis de grupo de las muestras con la prueba de Mann-Whitney. b. análisis pareado de las muestras con la prueba Wilcoxon.

Con el propósito de correlacionar el comportamiento de múltiples variables analizadas antes y después del tratamiento y el desenlace clínico de las pacientes se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA por sus siglas en inglés) el cual es un análisis de reducción de dimensiones en x-*componentes* para estudios con múltiples variables el cual permite determinar

la importancia de cada variable en el comportamiento de cada uno de los componentes principales. El PCA arroja para cada variable un valor sobre los componentes principales, el cual refleja la influencia que dicha variable tiene sobre cada componente (Tabla 7). En este caso, determinamos que una variable es relevante si el número absoluto es superior a 0.5. Este criterio permite de manera sistemática eliminar variables que no reflejen el comportamiento de las muestras, por ejemplo, las variables muy cercanas al centro, en ambas dimensiones, no ejercen ninguna influencia sobre los componentes (Figura 42a). Adicionalmente, el análisis permite determinar el valor que cada muestra tiene en cada uno de los componentes (Figura 42 b). El modelo se optimiza empleando las variables relevantes con el fin de asignar a cada componente la combinación de variables más adecuada (Tabla 7.).

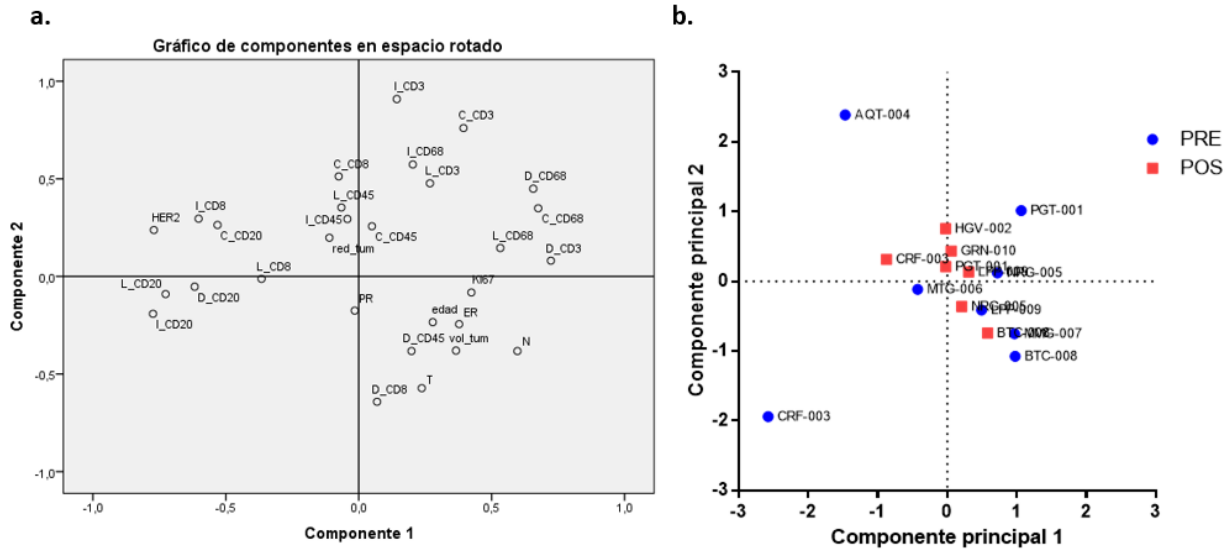

Figura 42. ***Análisis de componentes principales con todas las variables***. Resultados de la reducción de variables a dos componentes. a. Gráfica del pesa de cada variable en los dos componentes. b. Representación de los valores de cada pacientes en los dos componentes principales.

Luego de analizados los datos por PCA, se obtuvo la matriz de los componentes (dos componentes en este caso) descritos en la Tabla 7, la cual muestra los puntajes de cada variable en relación a cada uno de los dos componentes.

Variable	Comp 1	Comp 2
Vol_tum	0,366	-0,380
Red_tun	-0,110	0,198
Edad	0,278	-0,234
ER	0,378	-0,244
PR	-0,015	-0,175
HER2	-0,771	0,238
Ki67	0,242	-0,082

T	0,237	0,572
N	0,597	-0,382
C_CD68	0,675	0,349
I_CD68	0,203	0,573
L_CD68	0,532	0,146
D_CD68	0,656	0,449
C_CD45	0,050	0,257
I_CD45	-0,043	0,294
L_CD45	-0,065	0,353
D_CD45	0,198	-0,382
C_CD20	-0,531	0,264
I_CD20	-0,774	-0,192
L_CD20	-0,727	-0,090
D_CD20	-0,617	-0,053
C_CD8	-0,075	0,513
I_CD8	-0,602	0,296
L_CD8	-0,366	-0,012
D_CD8	0,069	-0,642
C_CD3	0,394	0,760
I_CD3	0,143	0,909
L_CD3	0,268	0,477
D_CD3	0,723	0,081

Tabla 7. ***Matriz de componentes rotados*.** Resultados del primer análisis con todas las variables incluidas y su respectivo peso en los dos componentes principales. Las variables en cursiva y negrita fueron las seleccionadas para optimizar el análisis de componentes principales pues tenían un valor mayor a 0.5 en alguno de los dos componentes.

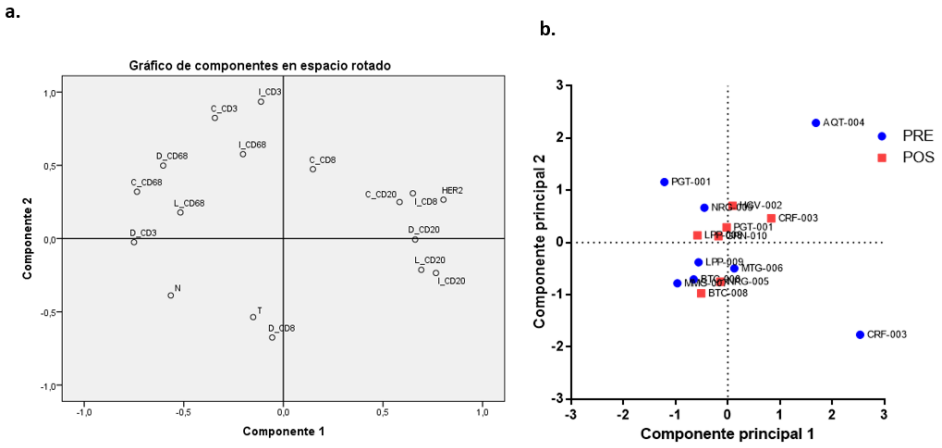

Figura 43. ***Análisis de componente principales optimizado con las variables de mayor peso***. Segundo análisis de componentes principales utilizando las variables con mayor valor en los componentes principales.

Se corrió un análisis optimizado con las variables seleccionadas (Tabla 7) y se obtuvo una gráfica de dos componentes y la respectiva gráfica de los valores asignados a cada paciente en cada componente (Figura 43 a y b). En esta grafica (Figura 43 b) la ubicación de cada individuo está determinada por la resultante del comportamiento de las variables de cada individuo en los dos componentes. En los dos análisis se observan en azul las muestras de las pacientes prequimioterapia y en rojo las muestras de pacientes luego de la quimioterapia. Lastimosamente no encontramos comportamientos que nos permitan diferenciar las muestras pre y pos-quimioterapia, ni en el análisis con todas las variables (Figura 42) ni en el análisis optimizado (Figura 43).

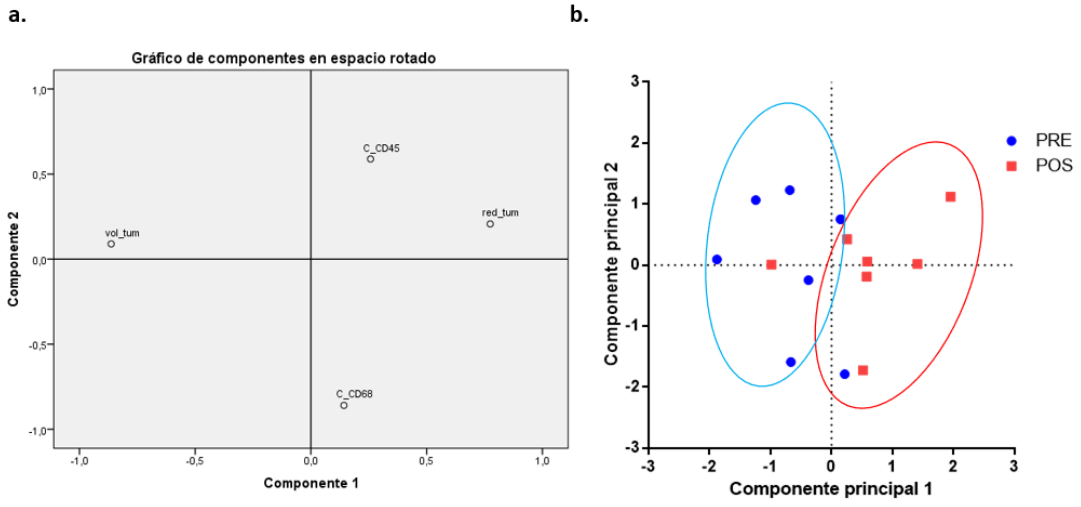

Figura 44. ***Análisis de componentes principales con variables de relevancia experimental***. Segundo análisis de componentes principales utilizando las variables con mayor valor en los componentes principales.

Por último, tomamos las variables experimentales que tuvieron un cambio significativo (Cantidad de células CD45+) y la tendencia de macrófagos a aumentar (Cantidad de células CD68+) en respuesta a NAC, y corrimos un análisis PCA en conjunto con las variables de tamaño tumoral y reducción del volumen tumoral. En este último análisis encontramos una agrupación de las pacientes pre-NAC hacia la izquierda de la gráfica, y pos-NAC hacia la derecha, sugiriendo que estas cuatro variables pueden explicarnos parcialmente el comportamiento de las muestras en respuesta al tratamiento. Sin embargo, creemos que estos análisis deberían repetirse en cohortes con un mayor número de pacientes que permitan asegurar con robustez el valor clínico y pronóstico de la infiltración de leucocitos y macrófagos en tumores de cáncer de mama y su respuesta al tratamiento.

DISCUSIÓN

El estudio del TME ofrece claridad sobre la fisiología de las interacciones celulares y moleculares que determinan en cierta medida el establecimiento y la progresión del cáncer, a la vez que ofrece oportunidades clínicas a nivel diagnóstico, pronóstico y terapéutico [124].

McAllister y Weinberg *et al.,* en el 2014 propusieron el concepto de un *ambiente sistémico inducido por el tumor* el cual determina la progresión del cáncer y la capacidad de metástasis [125]. Laplane en el 2018, recoge esta idea y plantea la existencia de 6 capas del TME: la primera que comprende las interacciones y simbiosis entre células tumorales. La segunda, el nicho, que definen como un concepto espacial/temporal que permite el inicio del desarrollo tumoral. Las siguientes tres capas siendo los ambientes confinados, proximales y periféricos, que, aunque se alejan del centro tumoral definen también el progreso o la regresión del cáncer. Por último, proponen el ambiente organismo-tumoral (TOE) como la última capa, donde se incluyen componentes no localizados intratumoralmente, ni en su vecindad, pero que afectan el desarrollo del cáncer [124].

Estas definiciones traen retos conceptuales, pues se debe teorizar sobre las comunicaciones entre los diferentes niveles organizacionales y al mismo tiempo, plantea la existencia de nuevos blancos terapéuticos, pues si el progreso tumoral depende del establecimiento de todas estas capas, bloqueando o restringiendo alguna de ellas se podría detener el crecimiento tumoral [124]. Por ejemplo, se ha demostrado en cáncer de mama la existencia de poblaciones de macrófagos de buen pronóstico FOLR2+, residentes de tejidos, y de mal pronóstico TREM+, que son derivados de poblaciones de monocitos infiltrantes que se diferencian a macrófagos en el TME [126].

Algunos autores han denominado a esta nueva visión, en la que se incluyen estructuras inmunes distantes al tumor (como nódulos linfáticos y médula ósea), al sistema nervioso y al rol del microbioma en el desarrollo del cáncer como ambiente organismo-tumoral (TOE) [127]. Aunque el estudio del TOE y no solo el TME ofrecerá en el futuro herramientas diagnósticas y terapéuticas más productivas en varios tipos de cáncer, el estudio del microambiente tumoral y particularmente del infiltrado inmune proximal en cáncer de mama ha demostrado ser costo-

efectivo en el contexto de la quimioterapia neoadyuvante, por lo que un análisis integrativo como el que proponemos es relevante en este contexto.

En este trabajo estandarizamos la técnica de ISSLU para el estudio del microambiente tumoral, y para estudios de “paisajismo inmune” del tejido. Está técnica resulta ser útil y costo-efectiva para hacer análisis de tejidos preservados en parafina. Permite ver las múltiples marcaciones en un solo campo, y analizar las imágenes para evaluar las diferentes poblaciones de interés, permitiendo evaluar los ambientes inmunes confinados, proximales y periféricos y al mismo tiempo la interacción célula tumoral – célula tumoral [124]. Todo esto, con los equipos y materiales disponibles en cualquier laboratorio de patología, demostrando que la antigenicidad de las proteínas se mantiene y que no existen interacciones resultado del uso de anticuerpos de manera secuencial (Figuras 7-17).

Encontramos algunas limitaciones con el uso de esta técnica, pues al no contar con un digitalizador automatizado las fotos no son tomadas exactamente en el mismo punto y la sobreposición de las imágenes se ve en baja resolución, afectando la evaluación de la colocalización de los marcadores (Figura 18 y 32) [23]. Sin embargo, las imágenes individuales si permiten hacer un muestreo (“scan”) de las poblaciones de interés sobre el mismo punto (Figuras 7-18 y Anexo 5). Adicionalmente, el tejido se va despegando a medida que pasan las marcaciones, es por esto que en algunas ocasiones solo logramos entre 5 o 7 marcaciones sobre la misma lámina. Es importante que, al momento de realizar las marcaciones, se tenga mucho cuidado con la manipulación de la lámina, cuidando los pasos de lavado y secado.

La quimioterapia neoadyuvante con antraciclinas, ciclofosfamida y taxanos es la primera línea del tratamiento contra el cáncer de mama, la cual ha demostrado tener un efecto significativo en la reducción del tamaño tumoral previo a la cirugía [128]. Clásicamente se ha descrito como un tratamiento inmunosupresor por su efecto citotóxico sobre poblaciones inmunes circulantes, sin embargo, estudios han demostrado que puede activar al sistema inmune porque induce muerte celular inmunogénica (MCI) en las células tumorales, las cuales emiten señales de peligro estimulando la respuesta inmune. Adicionalmente se ha reportado un efecto indirecto al inducir la muerte de células inmunoreguladoras infiltrantes como las Tregs y MDSCs y por ende mejorar la respuesta antitumoral [9, 30, 129, 130]. Por lo tanto, se ha planteado una interacción sinérgica y bidireccional entre el sistema inmune y la quimioterapia en donde el efecto antitumoral de la

NAC es mediado parcialmente por un efecto inmunológico que a su vez se potencia por la acción del tratamiento.

La NAC afecta la contextura inmune del TME, por ejemplo, Demaria et al. (2001) demostraron que el tratamiento basado en Paclitaxel incrementa la frecuencia de TILs en pacientes con cáncer de mama que respondieron a la quimioterapia [83]. Es importante resaltar que estos estudios se enfocan en la evaluación morfológica de linfocitos, sin tener en cuenta la expresión de marcadores y otras poblaciones celulares diferentes que pueden estar interviniendo en la inmunidad antitumoral, como es el caso de la infiltración de las lesiones primarias de cáncer de mama por células CD68low (macrófagos y DCs plasmacitoides) las cuales se asocian positivamente con la supervivencia sin recaídas [131]. El valor pronóstico de los recuentos de linfocitos T CD8+ que infiltran el tumor en pacientes con cáncer de mama ha sido confirmado en otros estudios [84, 132].

En cáncer de mama, se ha reportado la infiltración por células del sistema inmune innato y adaptativo: macrófagos, LB, LT y sus subpoblaciones, células NKs y DCs. Además, se ha evaluado la expresión de marcadores de agotamiento y quemoquinas como PD-L1, PD1, CTLA4 y CXCL13 [34, 133, 134].

El rol de estos marcadores celulares y moleculares en el pronóstico de la enfermedad no ha sido completamente elucidado. Algunos artículos incluidos en la revisión evaluaban TILs los cuales constituyen una población heterogénea, que se estudia de forma morfológica en láminas del tumor teñidas con H&E. Se ven como células pequeñas y poco complejas, que se encuentran en el estroma o en el centro del tumor, y pueden o no formar estructuras linfoides terciarias [135]. La mayoría no reportó diferencias significativas (Tabla 3), sin embargo, en el metaanálisis (Figura 21) vemos una disminución significativa de los TILs después de la NAC, la cual contradice la hipótesis de que la NAC aumenta la infiltración linfocitaria. Además, por la forma en la que se evalúan los TILs estos pueden incluir Linfocitos T, Linfocitos B e incluso, células NK que comparten la misma morfología celular, con posibles fenotipos reguladores o efectores distintos.

Según Pelekanou, *et al*., (2018) la disminución de TILs en respuesta a la NAC se podría explicar por dos posibles razones. Por un lado, que existe un efecto citotóxico de la NAC sobre esta población, o por el otro, que al detenerse la progresión tumoral se disminuye el tumor como

blanco del infiltrado inmune. Diferente a la idea de que la quimioterapia está induciendo señales de peligro y con esto la infiltración inmune [114], hipótesis que también es respaldada en [108, 111], vale la pena analizar si la respuesta inmune antitumoral de alguna forma depende de la carga tumoral antigénica. Si es así, al disminuirse las células tumorales por la citotoxicidad directa de la NAC y porque son blanco de las células inmunes, las señales de peligro del microambiente y la disminución de la carga de antígeno probablemente conlleva a una disminución de la infiltración del tumor por células inmunes.

La disminución de los TILs pos-NAC encontrada en el meta-análisis, contrasta con el aumento de CD45 encontrado por inmunohistoquímica secuencial (Figura 27). Urueña, *et al*., son los únicos autores en evaluar esta población en los artículos incluidos en la revisión sistemática y no encontraron un cambio significativo en respuesta al tratamiento. CD45 es un marcador del linaje hematopoyético, se encuentra en todos los leucocitos con mayor expresión en linfocitos y pertenece a la familia de tirosina fosfatasas transmembranales [136]. Nuevamente, como con los TILs, su aumento no puede asignarse a una población específica, pues está presente en la superficie celular de LT, LB, NKs, y todos sus posibles fenotipos regulatorios. Pero el hallazgo de las tinciones si parece concordar con la hipótesis que la NAC aumenta la infiltración en tumores. Sería interesante evaluar esta población en momentos más tempranos del tratamiento antitumoral, pues los resultados podrían concordar con lo encontrado por Hee-Park, *et al*., (2020), que reportan un aumento inicial de los TILs después de un ciclo de NAC [97].

En cuanto al sistema inmune innato, la población que más se ha estudiado en el contexto de la infiltración tumoral son los TAMs. Sin embargo, no se ha podido llegar a un consenso sobre los marcadores que deben ser utilizados para definir las subpoblaciones de Mϕ. Canónicamente se habla de dos tipos de macrófagos, los Mϕ-M1 que tienen un perfil proinflamatorio y se consideran deseables por tener una actividad antitumoral potente [137]. Por otro lado, los Mϕ-M2 son antiinflamatorios y promueven la angiogénesis, lo que puede favorecer algunos tumores [138]. En los resultados de la revisión sistemática no se observó una tendencia clara en el cambio de la infiltración de Mϕ totales, ni en los Mϕ-M1 o Mϕ-M2 en respuesta a la NAC en los artículos incluidos. Nuevos estudios han propuesto marcadores novedosos como TREM2 y FOLR2, que han demostrado una asociación significativa con la respuesta clínica de los pacientes [126]. Por medio de la ISSLU no encontramos ninguna diferencia en la infiltración de Mϕ CD68+, pero si vimos una tendencia a aumentar en el análisis grupal (Figura 28a), con el uso de nuevos

marcadores como FOLR2 y TREM2, que delimiten las poblaciones M1/M2 probablemente se vea resultados prometedores en cáncer de mama. Sin embargo, utilizando CIBERSORTx, el cual evalúa la población de Mϕ M0/M1/M2, encontramos diferentes comportamientos. Primero, los Mϕ-M0 no cambiaron a nivel global grupal ni pareado entre los tres puntos de tiempo. Los Mϕ-M1 (antitumorales) disminuyen significativamente después de un ciclo de NAC y también al momento de la cirugía. Y los Mϕ-M2 (protumorales) aumentan después de un ciclo y al momento de la cirugía (Figura 38), lo cual va en contra de lo esperado, pues la NAC debería estar disminuyendo la población de TAMs, al generar efecto citotóxico sobre las células tumorales [139]. Es interesante ver que el aumento de la población de Mϕ-M2 se ve acompañado de un aumento significativo en la población de monocitos (Figura 37b), por lo cual se podría pensar que esta población pro-tumoral si está siendo derivada de monocitos circulantes, y corresponde a la población TREM2 descrita en [126].

La citotoxicidad directa de los Mϕ sobre células tumorales está mediada por dos mecanismos, el primero generado por liberación de especies reactivas de oxígeno y óxido nítrico. Y el segundo, más rápido, inducido por citotoxicidad mediada por anticuerpos (ADCC por sus siglas en inglés), el cual requiere de la producción de anticuerpos antitumorales. Este mecanismo implica una interacción directa con LB en el TME, pues la actividad de los Mϕ requiere de la activación de LB. En la revisión sistemática solo dos artículos incluidos evaluaron esta población, uno reportó una disminución en respuesta a la NAC [55] y el otro no encontró cambios significativos [116]. Este último resultado concuerda con lo encontrado por ISSLU en este trabajo, pues no observamos cambios en la infiltración de esta población medida por CD20 (Figura 29). Sin embargo, evaluando las poblaciones por CIBERSORTx encontramos una disminución de los LB-naive (Figura 34 a) y una disminución de los LB de memoria en respuesta a la NAC (Figura 34 b). Por último, la población de células plasmáticas, responsables de la producción de anticuerpos, no cambia con el tratamiento (Figura 43 c y f), lo cual podría verse reflejado en la disminución de los Mϕ-M1 en TME. Sería interesante evaluar más a fondo la interacción entre estas poblaciones para elucidar a profundidad su rol en la actividad antitumoral en el microambiente proximal, y su efecto en la respuesta al tratamiento.

Además de Mϕ y LB, en la revisión sistemática también se incluyeron artículos que midieron neutrófilos, células dendríticas y células NK, estas poblaciones no fueron medidas por ISSLU,

pero si por CIBERSORTx. En los pacientes con cáncer, los neutrófilos en sangre se han asociado con una mayor producción de radicales libres y un mal pronóstico clínico [140]. Igualmente, los neutrófilos asociados a tumor (TINs), que son atraídos al sitio del tumor por los TAMs, también se han asociado con una pobre DFS y OS [141]. El único artículo que evaluó esta población no reporto cambios significativos a nivel intratumoral ni estromal [106], lo cual concuerda con los encontrado por CIBERSORTx, pues no vimos ninguna diferencia significativa a nivel de transcriptoma en esta población (Figura 29 c y f). Mas estudios sobre esta población son necesarios, pues no se ha elucidado a profundidad su rol en la inmunidad tumoral.

Por su lado, las NKs son las células antitumorales por excelencia y su alta capacidad citotóxica explica su asociación positiva con factores clínicos [142, 143]. No fue posible realizar un metaanálisis entre los dos artículos que reportaron porcentajes de NKs antes y después de la NAC, y tampoco se pudo encontrar una tendencia, puesto que uno de ellos reportó un aumento en el estroma en respuesta a la quimioterapia [56], pero en el otro estudio no se encontraron cambios [118]. Este último resultado concuerda con lo encontrado por CIBERSORTx, pues no vimos diferencias significativas ni después de un ciclo, ni al terminar la NAC. Lo cual resulta contradictorio con nuestra hipótesis, pues si la NAC aumentará la actividad antitumoral y al ser las NKs las células citotóxicas por excelencia, se esperaría observar un aumento de esta población.

Dentro de los componentes del sistema inmune adaptativo que se encuentran infiltrando el tumor están los LT-CD4 y CD8 antitumorales, los cuales reconocen antígenos y posteriormente inducen una respuesta inmune efectiva contra el cáncer. Adicionalmente, se ha reportado la presencia de LT-CD4 reguladores, los cuales disminuyen la respuesta inmune antitumoral al suprimir la activación de otras células inmunes. El impacto de la infiltración de estas células es aún controversial puesto que en algunos modelos como el cáncer orofaríngeo es positivo, mientras que, en el cáncer de colon, de ovario y cervical es de mal pronóstico [33, 144-149].

Sin embargo, reportes previos del grupo de Inmunología y Medicina Traslacional, demuestran que, en pacientes con cáncer de mama a nivel de sangre periférica existe un aumento en la maduración de DCs, y una disminución en la expresión de receptores de agotamiento de LT en respuesta a la NAC [21, 22, 128, 150, 151]. Esto nos sugiere que la NAC podría tener un mecanismo específico de activación del compartimiento T en el TIME, el cual es respaldado por

lo que encontramos con la herramienta CIBERSORTx en el estudio del transcriptoma tumoral, en que detectamos un aumento del compartimiento de DCs activadas (Figura 37 f) y un aumento después de un ciclo de NAC de los LT-CD8 (Figura 35 d) y de los LT-CD4 quiescentes (Figura 35 e). En este trabajo esperábamos ver un aumento de la infiltración de LT-CD3 y LT-CD8 positivos, sin embargo, estas poblaciones no cambiaron significativamente en respuesta a la NAC (Figura 30 y 31). Esto podría en parte ser explicado por el bajo número de muestras incluidas en el análisis. A futuro, se podría evaluar una cohorte más grande de pacientes, e incluir nuevos marcadores como CD4, CXCL13, PD1, CTLA4, pues otra posible explicación podría ser que no aumente el número total de LT, pero sí que disminuya la expresión de receptores de agotamiento *in-situ* y con esto aumente la actividad efectora de estas células, como lo reportado en sangre periférica [22]

Resulta interesante notar el aumento de LT-CD4 quiescentes, lo cual podría ser explicado en parte, por la expansión de LT-CD4 de memoria *stem-like*, que podrían estar expresando genes de células vírgenes o no activadas, pero corresponder a células que ya experimentaron un reconocimiento previo del antígeno [152]. Otros trabajos han reportado que estas poblaciones quiescentes podrían ser responsables de mantener el pool de LT-CD8 efectores antitumorales en el TME [153], por lo cual explorar la hipótesis de que estos LT-CD4 quiescentes estén manteniendo el pool de LT-CD4 antitumorales resultaría de gran impacto para los estudios de inmunología tumoral.

En la revisión sistemática encontramos tres trabajos que midieron las población de DCs [53, 56, 109], aunque no se pudo realizar un metaanálisis, los tres estudios reportaron un aumento global de las DCs en las muestras pos-quimioterapia, lo cual también concuerda con lo encontrado en CIBERSORTx (Figura 37 f), y en sangre periférica. Adicionalmente, Hornychova incluyó a CD83 y S100, marcador de maduración de las DCs, lo cual sugiere que estas células están presentado antígeno de manera adecuada y reportan un aumento de su expresión en el estroma en respuesta a la NAC [21, 22, 128, 150, 151]. Por otra parte, con los resultados de la revisión también fue posible realizar meta-análisis sobre las poblaciones de LT: CD3, CD4 y CD8 (Figura 22, 23, 24, y 25), sin embargo, ninguno mostró diferencias significativas pre y pos-NAC, en sintonía con lo encontrado en este trabajo por ISSLU (Figura 30 y 31), lo cual también podría ser atribuido no a un aumento en el número total de LT sino a la activación de esta población lo cual explique el aumento en su actividad antitumoral en respuesta al tratamiento.

Para el caso de las células FOXP3, el efecto de la quimioterapia es más evidente pues estudios experimentales han demostrado que las Tregs son más sensibles a la NAC [110]. Así mismo, se ha propuesto que la disminución de las Tregs posterior a la quimioterapia puede ser utilizado como un marcador predictivo de PCR [146]. Esto va en concordancia con lo encontrado en el metaanálisis (Figura 26), pues efectivamente hay una disminución significativa de esta población posterior a la quimioterapia y con lo encontrado por CIBERSORTx (Figura 36), en que vemos un aumento inicial de esta población después de un ciclo de NAC, pero una disminución significativa en la muestra pos al momento de la cirugía en comparación con la biopsia y después de un ciclo. Es importante resaltar que los linfocitos T reguladores son células heterogéneas, por lo cual identificar esta población con solo Foxp3 puede ser insuficiente. Esto se pudo evidenciar en un trabajo donde, al evaluar las Tregs con los marcadores Foxp3 y CD25 encontraron que las Tregs Foxp3+ CD25+ se correlacionan con un mejor overall survival, mientras que el subset de solo Foxp3+ no lo hacía, a pesar que en ambos casos se redujeron significativamente después de la NAC [54]. Estos resultados enfatizaron la importancia de usar más de un marcador para identificar subconjuntos de Tregs.

El TME puede ser altamente inmunosupresor, por eso algunos autores han propuesto la medición del ratio CD8/Foxp3, pues la sola presencia de LT CD8 (CTLs) podría no ser suficiente para generar una respuesta antitumoral efectiva, si hay un elevado número de células reguladoras suprimiendo la respuesta inmunológica citotóxica [50, 81, 105]. Los artículos que reportan dicho indicador demuestran que el aumento de este ratio está relacionado con un mejor pronóstico clínico [49, 81, 105] por lo cual la evaluación de este ratio puede ser de gran utilidad a la hora de determinar subgrupos de pacientes que pueden beneficiarse de otro tipo de inmunoterapias como los anticuerpos anti-punto de control [112].

Varios artículos incluidos en la revisión sistemática evaluaron la presencia de puntos de control inmunitario como CTLA-4, LAG3, TIM3 y PD-1 en células infiltrantes, estromales o tumorales antes y después de la quimioterapia (Tabla 5). La expresión de estos marcadores regula la activación inapropiada y prolongada de los LT manteniendo la tolerancia periférica y previniendo autoinmunidad, por ejemplo, CTLA-4 se expresa en LT activados y en Tregs [154]. Junto con CTLA-4, PD-1 y su ligando PD-L1 genera una vía de inhibitoria en varios tejidos, lo que termina por disminuir algunas funciones de LT como la citotoxicidad, proliferación y producción de citoquinas [155]. Los tumores pueden explotar estas vías de control para evadir la respuesta

inmune, de hecho, la expresión de PD-L1 se correlaciona con el tamaño, grado, diseminación metastásica del tumor, así como con los niveles reducidos de LT-CD8+ [156, 157].

Los artículos incluidos en la revisión sistemática no reportan de manera uniforme la tendencia de cambio de estos marcadores a excepción de CTLA-4, que disminuye luego de la NAC, sin embargo, este marcador fue evaluado *in-situ* únicamente por un artículo incluido [48]. Por su parte PD-1 tiende a aumentar en los LT CD8+ [112, 119] mientras que disminuye en los LT CD4+ [112]. Si se considera la respuesta clínica, PD-1 disminuye únicamente en quienes llegan a pCR [112]. En la mayoría de los estudios la expresión de PD-L1 se mantuvo estable o disminuyó luego de la NAC, sin embargo, el único artículo que reporta un aumento lo hace solamente en células estromales [50]. La expresión de LAG-3 en LT-CD8 aumenta luego de la NAC en pacientes con mala respuesta clínica [119] y disminuye de manera general a nivel estromal [115]. Considerando la evaluación de distintos marcadores de agotamiento, algunos estudios sugieren la utilidad clínica de bloquear PD-1 y LAG-3 en conjunto [119, 158, 159]. Las diferencias en los resultados y el conflicto en estos se derivan probablemente de i) la heterogeneidad del cáncer de mama en términos de perfiles moleculares y mecanismos oncogénicos entre distintos tipos o subtipos [50], ii) de los puntos de corte para establecer la positividad de ciertos marcadores y iii) las diferencias en el estado de activación de los LT y su producción de citoquinas en respuesta a la NAC [120]

Algunos artículos incluidos en la revisión sistemática y los datos utilizados para el análisis transcripcional evaluaron los cambios de marcadores celulares y moleculares en la respuesta temprana a la quimioterapia (un solo ciclo de NAC) [50, 97]. Dos artículos observaron un incremento en los niveles de TILs intratumorales y estromales después de un ciclo de la NAC en pacientes que presentaron una respuesta favorable [97]. Sin embargo, Hee-Park reporta una disminución de los TILs al terminar el esquema de NAC. Este comportamiento indicaría que, en un primer momento la NAC induce MCI y aumenta la infiltración del tumor, pero a medida que este disminuye su tamaño, se reducen las señales de peligro y se resuelve la respuesta inmune antitumoral, hipótesis que es respaldada por los resultados encontrados en el transcriptoma tumoral, donde las poblaciones de LT-CD4 y CD8 aumentan significativamente después de un ciclo, pero disminuyen al momento de la cirugía (Figura 35 d y 3). Y que al mismo tiempo podría explicarse por la disminución de la carga antigénica, al disminuir el tamaño tumoral por el tratamiento quimioterapéutico.

La expresión de PD1 y PD-L1 y su asociación con la respuesta antitumoral presenta resultados contradictorios. Por su parte, Graeser, *et al*., (2021) reporta una disminución de PD-L1 en etapas tempranas de la terapia [107], que se podría relacionar con la eliminación de células tumorales; y un aumento de la expresión de PD-1 en células inmunes que sugeriría una activación de los LT [153, 160] sin embargo, Lee, *et* al., 2019 reporta un aumento en la expresión de PD-L1 que se correlacionó con un peor pronóstico [50].

Las citoquinas secretadas por las células que componen el TME modulan la respuesta inmune innata y adaptativa, sin embargo su rol en el control o progresión del cáncer y en la sensibilidad de agentes quimioterapéuticos no está claramente establecida [161] en parte porque la dinámica de comunicación entre células tumorales y células inmunes a través de citoquinas y quimioquinas se modifica durante la iniciación, progresión e intervención terapéutica del cáncer [162]. Además, el complejo sistema de citoquinas hace que se dificulte la atribución de cambios en su producción y función como causa o consecuencia del proceso neoplásico o como respuesta inmune contra el desarrollo del cáncer [162].

Sólo 3 artículos incluidos en la revisión evaluaron la presencia de citoquinas in-situ y ninguno evaluó quemoquinas aunque estas se han relacionado con la migración e infiltración de células inmunes, así como con la angiogénesis y la “stemness” tumoral [162, 163]. En la mayoría de los casos no hubo cambios significativos en los niveles de citoquinas en respuesta al tratamiento, con la excepción de una disminución de IL-4 post-NAC y una tendencia a la baja de IL-2. Por su lado, los niveles de IL-10 y TGF-B no variaron en respuesta a la NAC. [48].

La disminución conjunta de la IL-2 y la IL-4 podría estar induciendo una disminución de la función de ciertas Tregs luego de la NAC [164] lo que explicaría la disminución de FoxP3 encontrada en el meta-análisis (Figura 26) y en los análisis transcripcionales (Figura 36 b), así como la asociación significativa entre la expresión post-NAC de IL-10 e IL-17 y el fallo para obtener pCR [48].

Con los resultados de la revisión sistemática se pudo establecer una disminución significativa de los TILs y de la expresión de FOXP3 después de la NAC, está última soportada por los análisis transcripcionales. Por medio de la ISSLU encontramos un aumento en la infiltración leucocitaria

total, evaluada por CD45. Y por medio de los análisis transcripcionales pudimos evidenciar la activación del compartimiento de LT en la respuesta temprana a la NAC, probablemente explicada por la activación de DCs en el microambiente, resultado que también se ve respaldado por la revisión sistemática.

De manera contradictoria con la hipótesis de que la NAC aumenta la actividad antitumoral, encontramos un aumento de lo Mϕ-M2 y una disminución de los Mϕ-M1, ambos en la respuesta temprana y tardía a la NAC, al igual que no vimos diferencias en el compartimiento de NKs ni de células plasmáticas. Los cual podría indicar que el efecto de este esquema se directamente sobre la activación de DCs y con esto, la activación de LT, y que este efecto esta mediado directamente por la carga antigénica.

Por último, en los PCA no encontramos asociaciones estadísticamente significativas que nos permitieran sugerir como biomarcadores con valor pronóstico la infiltración de los tumores por las poblaciones aquí evaluadas. Este resultado es probablemente atribuible al limitado número de muestras incluidas en el trabajo. Sin embargo, realizado un análisis con variables seleccionadas: i) infiltrado de células CD45+ el cual aumentó significativamente pos-NAC; ii) tendencia al aumento de la infiltración de células CD68+ y las variables de tamaño y grado de reducción tumoral, de manera interesante, con el limitado número de casos (Figura 44), fue posible evidenciar una segregación diferencial de las muestras pre y pos-NAC. Nuestros resultados sugieren que se debe persistir en estudios adicionales para validar biomarcadores en cáncer de mama que permitan predecir la respuesta clínica al tratamiento. Con los resultados de este trabajo de investigación creemos que el estudio del efecto de la NAC sobre el TIME en estudios de cohorte, utilizando las herramientas implementadas en este trabajo (ISSLU y CIBERSORTx), será importante para la identificación de biomarcadores, monitoreo del tumor con el fin de incorporar estrategias de inmunoterapia en el contexto de la NAC, así como para entender mecanismo biológicos sobre los que reposa la inmunidad contra este tumor.

Apropiación Social y divulgación del Conocimiento

Como parte de los resultados de esta tesis de maestría, se realizaron diferentes actividades de apropiación social del conocimiento, referentes a los resultados obtenidos en la tesis, y al diagnóstico del estado e implementación de la Medicina Traslacional en Colombia. Estos productos hacen parte del trabajo de diferentes miembros del grupo de Inmunología y Medicina Traslacional.

1. **Artículos** Se sometió los resultados de la revisión sistemática y el meta-análisis a la reviste PloS como autora principal (Anexo 6). Se sometió un artículo primario sobre el efecto de la NAC en el compartimiento de LT circulantes como coautora (Anexo 7).
2. **Pasantía de investigación** Se realizó una pasantía de investigación a la Universidad de Melbourne con título “Maintenance of CD8+ T cell responses during chronic infection and anti-tumor immunity” (Anexo 8). Con los resultados de esta pasantía se participó como coautora en un artículo publicado por el grupo del investigador Axel Kallies (Anexo 9).
3. **Eventos de difusión del conocimiento:** Se realizaron participaciones en distintas plataformas que tuvieron como objetivo principal socializar los resultados de este trabajo y de los avances en términos de inmunoterapia y biomarcadores en cáncer de mama logrados por el grupo. Primero, se hizo la presentación de resultados de este trabajo y del trabajo del grupo en el XIII Congreso de la Asociación Colombiana de Alergia, Asma e Inmunología (ACAAI) y el V Encuentro de la Asociación Colombiana de Inmunología (ACOI) en modalidad oral, ganando el segundo puesto (Anexo 10) y poster (Anexo 11 y 12). Segundo, se hizo una participación en programas radiales de radio UN sobre inmunoterapia (Anexo 13). Por último, se organizó un foro titulado “El futuro de la Medicina Traslacional en Colombia: Avances internacionales y nacionales” en donde se abordó desde una perspectiva investigativa y regulatoria el estado de la Medicina Traslacional en el país y a nivel regional e internacional (Anexo 14).

4. **Documentos de recomendaciones concernientes a las terapias médicas avanzadas:** En conjunto con otros miembros del grupo de Inmunología y Medicina Traslacional se construyeron dos documentos de recomendaciones a personal clínico sobre la importancia de la preservación del tejido tumoral con el objetivo de dinamizar la implementación de la medicina traslacional y de la investigación en biomarcadores en el país. (Anexos 15 y 16).

REFERENCIAS

1. Laplane, L., et al., *The Multiple Layers of the Tumor Environment.* Trends in cancer, 2018. **4**(12).
2. Fridman, W.H., et al., *The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome*, in *Nat Rev Cancer*. 2012: England. p. 298-306.
3. Pages, F., et al., *International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study.* Lancet, 2018. **391**(10135): p. 2128-2139.
4. F, Pager., et al., *The consensus Immunoscore in phase 3 clinical trials; potential impact on patient management decisions.* Oncoimmunology, 2020. **9**(1).
5. HR, Ali., et al., *Computational pathology of pre-treatment biopsies identifies lymphocyte density as a predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer.* Breast cancer research : BCR, 2016. **18**(1).
6. Burugu, S., K. Asleh-Aburaya, and T.O. Nielsen, *Immune infiltrates in the breast cancer microenvironment: detection, characterization and clinical implication.* Breast Cancer, 2017. **24**(1): p. 3-15.
7. G, A., et al., *High expression of lymphocyte-associated genes in node-negative HER2+ breast cancers correlates with lower recurrence rates.* Cancer research, 2007. **67**(22).
8. AE, T., et al., *Improved prognostic classification of breast cancer defined by antagonistic activation patterns of immune response pathway modules.* BMC cancer, 2010. **10**.
9. SM, M., et al., *An evaluation of the clinical significance of FOXP3+ infiltrating cells in human breast cancer.* Breast cancer research and treatment, 2011. **127**(1).
10. Liu, W.M., et al., *Pre-treatment with chemotherapy can enhance the antigenicity and immunogenicity of tumours by promoting adaptive immune responses.* Br J Cancer, 2010. **102**(1): p. 115-23.
11. Albert, M.L., B. Sauter, and N. Bhardwaj, *Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs.* Nature, 1998. **392**(6671): p. 86-9.
12. Apetoh, L., et al., *Molecular interactions between dying tumor cells and the innate immune system determine the efficacy of conventional anticancer therapies.* Cancer Res, 2008. **68**(11): p. 4026-30.
13. Casares, N., et al., *Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death.* J Exp Med, 2005. **202**(12): p. 1691-701.
14. Zitvogel, L., O. Kepp, and G. Kroemer, *Decoding cell death signals in inflammation and immunity.* Cell, 2010. **140**(6): p. 798-804.
15. DA, B.-E., et al., *Autologous Dendritic Cells in Combination With Chemotherapy Restore Responsiveness of T Cells in Breast Cancer Patients: A Single-Arm Phase I/II Trial.* Frontiers in immunology, 2021. **12**.
16. Sistigu, A., et al., *Cancer cell-autonomous contribution of type I interferon signaling to the efficacy of chemotherapy.* Nat Med, 2014. **20**(11): p. 1301-9.
17. Zhang, B., et al., *Induced sensitization of tumor stroma leads to eradication of established cancer by T cells.* J Exp Med, 2007. **204**(1): p. 49-55.
18. Reits, E.A., et al., *Radiation modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy.* J Exp Med, 2006. **203**(5): p. 1259-71.

19. Apetoh, L., et al., *The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy.* Immunol Rev, 2007. **220**: p. 47-59.
20. A, T., et al., *Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin.* Oncogene, 2010. **29**(4).
21. Bernal Estévez, D.A.P.L., Carlos Alberto., *Evaluación de la capacidad inmuno-estimulante de la terapia neo-adyuvante con Doxorrubicina y Ciclofosfamida en pacientes con cáncer de mama*. 2017.
22. Rodríguez Rodríguez, I.J.P.L., Carlos Alberto., *Estudio celular de la inmunosenescencia en adultos mayores vacunados y en pacientes con cáncer de mama.* 2021.
23. Remark, R., et al., *In-depth tissue profiling using multiplexed immunohistochemical consecutive staining on single slide.* Sci Immunol, 2016. **1**(1): p. aaf6925.
24. G, A., et al., *Multiplexed Immunohistochemical Consecutive Staining on Single Slide (MICSSS): Multiplexed Chromogenic IHC Assay for High-Dimensional Tissue Analysis.* . 2020: Methods Mol Biol. . p. 497-519. .
25. Steen, C., et al., *Profiling cell type abundance and expression in bulk tissues with CIBERSORTx*. MIMB. Vol. 2117. 2020, Springer Link: Methods Mol Biol. 135-157.
26. AM, N., et al., *Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles.* Nature methods, 2015. **12**(5).
27. 2020, G. *Estadísticas para Colombia 2020. International Agency for Cancer Research.* 2021; Available from: https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/170-colombia-fact-sheets.pdf.
28. (INC)., I.N.d.C., *Anuario estadístico 2020.* Vol. 18. 2021.
29. Dunn, G.P., et al., *Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape.* Nat Immunol, 2002. **3**(11): p. 991-8.
30. Zhu, S., et al., *Differential regulation and function of tumor-infiltrating T cells in different stages of breast cancer patients.* Tumour Biol, 2015. **36**(10): p. 7907-13.
31. Crespo, J., et al., *T cell anergy, exhaustion, senescence, and stemness in the tumor microenvironment.* Curr Opin Immunol, 2013. **25**(2): p. 214-21.
32. Denkert, C., et al., *Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy.* Lancet Oncol, 2018. **19**(1): p. 40-50.
33. Ali, H.R., et al., *Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12,439 patients.* Ann Oncol, 2014. **25**(8): p. 1536-43.
34. Gu-Trantien, C., et al., *CD4(+) follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival.* J Clin Invest, 2013. **123**(7): p. 2873-92.
35. van Vloten, J.P., et al., *Critical Interactions between Immunogenic Cancer Cell Death, Oncolytic Viruses, and the Immune System Define the Rational Design of Combination Immunotherapies.* J Immunol, 2018. **200**(2): p. 450-458.
36. Ghiringhelli, F., et al., *Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients.* Cancer Immunol Immunother, 2007. **56**(5): p. 641-8.
37. Hortobagyi, G.C., J. D´Orsi, S. Edge, E. Mittendorf H. Rugo, L. Solin, D. Weaver, D. Winchester, D. Giuliano A., *Breast Cancer Staging System AJCC 8th Edition*. 2017. p. 589-636.
38. Akram, M., et al., *Awareness and current knowledge of breast cancer.* Biol Res, 2017. **50**(1): p. 33.
39. Burnet, M., *Cancer; a biological approach. I. The processes of control.* Br Med J, 1957. **1**(5022): p. 779-86.

40. Shankaran, V., et al., *IFNgamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity.* Nature, 2001. **410**(6832): p. 1107-11.
41. Vesely, M.D., et al., *Natural innate and adaptive immunity to cancer.* Annu Rev Immunol, 2011. **29**: p. 235-71.
42. Mittal, D., et al., *New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape.* Curr Opin Immunol, 2014. **27**: p. 16-25.
43. Halama, N., et al., *Localization and density of immune cells in the invasive margin of human colorectal cancer liver metastases are prognostic for response to chemotherapy.* Cancer Res, 2011. **71**(17): p. 5670-7.
44. Dieu-Nosjean, M.C., et al., *Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures.* J Clin Oncol, 2008. **26**(27): p. 4410-7.
45. E, G.-M., et al., *Tumor-infiltrating immune cell profiles and their change after neoadjuvant chemotherapy predict response and prognosis of breast cancer.* Breast cancer research : BCR, 2014. **16**(6).
46. Abdelrahman, A.E., et al., *Clinicopathological significance of the immunologic signature (PDL1, FOXP3+ Tregs, TILs) in early stage triple-negative breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy.* Ann Diagn Pathol, 2021. **51**: p. 151676.
47. Demir, L., et al., *Predictive and prognostic factors in locally advanced breast cancer: effect of intratumoral FOXP3+ Tregs.* Clinical & experimental metastasis, 2013. **30**(8).
48. Kaewkangsadan, V., et al., *Crucial Contributions by T Lymphocytes (Effector, Regulatory, and Checkpoint Inhibitor) and Cytokines (TH1, TH2, and TH17) to a Pathological Complete Response Induced by Neoadjuvant Chemotherapy in Women with Breast Cancer.* Journal of immunology research, 2016. **2016**.
49. Ladoire, S., et al., *In situ immune response after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer predicts survival.* J Pathol, 2011. **224**(3): p. 389-400.
50. Lee, J., D. Kim, and A. Lee, *Prognostic Role and Clinical Association of Tumor-Infiltrating Lymphocyte, Programmed Death Ligand-1 Expression with Neutrophil-Lymphocyte Ratio in Locally Advanced Triple-Negative Breast Cancer.* Cancer research and treatment, 2019. **51**(2).
51. Vanguri, R., et al., *Tumor Immune Microenvironment and Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Hormone Receptor/HER2+ Early Stage Breast Cancer.* Clinical breast cancer, 2022. **22**(6).
52. Oda, N., et al., *Intratumoral regulatory T cells as an independent predictive factor for pathological complete response to neoadjuvant paclitaxel followed by 5-FU/epirubicin/cyclophosphamide in breast cancer patients.* Breast cancer research and treatment, 2012. **136**(1).
53. Waks, A., et al., *The Immune Microenvironment in Hormone Receptor-Positive Breast Cancer Before and After Preoperative Chemotherapy.* Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2019. **25**(15).
54. Zhang, L., et al., *The predictive and prognostic value of Foxp3+/CD25+ regulatory T cells and PD-L1 expression in triple negative breast cancer.* Annals of diagnostic pathology, 2019. **40**.
55. García-Martínez, E., et al., *Tumor-infiltrating immune cell profiles and their change after neoadjuvant chemotherapy predict response and prognosis of breast cancer.* Breast cancer research : BCR, 2014. **16**(6).
56. Hornychova, H., et al., *Tumor-infiltrating lymphocytes predict response to neoadjuvant chemotherapy in patients with breast carcinoma.* Cancer investigation, 2008. **26**(10).

57. Shou, J., et al., *Worse outcome in breast cancer with higher tumor-infiltrating FOXP3+ Tregs : a systematic review and meta-analysis.* BMC Cancer, 2016. **16**: p. 687.
58. Mendes, F., et al., *The role of immune system exhaustion on cancer cell escape and anti-tumor immune induction after irradiation.* Biochim Biophys Acta, 2016. **1865**(2): p. 168-75.
59. Jiang, Y., Y. Li, and B. Zhu, *T-cell exhaustion in the tumor microenvironment.* Cell Death Dis, 2015. **6**: p. e1792.
60. Prado-Garcia, H., S. Romero-Garcia, and J.S. Lopez-Gonzalez, *The role of exhaustion in tumor-induced T cell dysfunction in cancer*, in *Cancer Immunology*. 2015, Springer. p. 61-75.
61. Okoye, I.S., et al., *Coinhibitory Receptor Expression and Immune Checkpoint Blockade: Maintaining a Balance in CD8(+) T Cell Responses to Chronic Viral Infections and Cancer.* Front Immunol, 2017. **8**: p. 1215.
62. Sun, S., et al., *PD-1(+) immune cell infiltration inversely correlates with survival of operable breast cancer patients.* Cancer Immunol Immunother, 2014. **63**(4): p. 395-406.
63. Alcover, A. and B. Alarcon, *Internalization and intracellular fate of TCR-CD3 complexes.* Crit Rev Immunol, 2000. **20**(4): p. 325-46.
64. Gonzalez-Amaro, R., et al., *Is CD69 an effective brake to control inflammatory diseases?* Trends Mol Med, 2013. **19**(10): p. 625-32.
65. Alexe, G., et al., *High expression of lymphocyte-associated genes in node-negative HER2+ breast cancers correlates with lower recurrence rates.* Cancer Res, 2007. **67**(22): p. 10669-76.
66. Teschendorff, A.E., et al., *Improved prognostic classification of breast cancer defined by antagonistic activation patterns of immune response pathway modules.* BMC Cancer, 2010. **10**: p. 604.
67. Mahmoud, S.M., et al., *An evaluation of the clinical significance of FOXP3+ infiltrating cells in human breast cancer.* Breast Cancer Res Treat, 2011. **127**(1): p. 99-108.
68. Granados, D.P., et al., *MHC I-associated peptides preferentially derive from transcripts bearing miRNA response elements.* Blood, 2012. **119**(26): p. e181-91.
69. Tongu, M., et al., *Immunogenic chemotherapy with cyclophosphamide and doxorubicin against established murine carcinoma.* Cancer Immunol Immunother, 2010. **59**(5): p. 769-77.
70. Tesniere, A., et al., *Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin.* Oncogene, 2010. **29**(4): p. 482-91.
71. Viaud, S., et al., *Dendritic cell-derived exosomes for cancer immunotherapy: what's next?* Cancer Res, 2010. **70**(4): p. 1281-5.
72. Blachere, N.E., R.B. Darnell, and M.L. Albert, *Apoptotic cells deliver processed antigen to dendritic cells for cross-presentation.* PLoS Biol, 2005. **3**(6): p. e185.
73. Nowak, A.K., R.A. Lake, and B.W. Robinson, *Combined chemoimmunotherapy of solid tumours: improving vaccines?* Adv Drug Deliv Rev, 2006. **58**(8): p. 975-90.
74. Groenendyk, J., J. Lynch, and M. Michalak, *Calreticulin, Ca2+, and calcineurin - signaling from the endoplasmic reticulum.* Mol Cells, 2004. **17**(3): p. 383-9.
75. Chaput, N., et al., *Molecular determinants of immunogenic cell death: surface exposure of calreticulin makes the difference.* J Mol Med, 2007. **85**(10): p. 1069-76.
76. Panaretakis, T., et al., *The co-translocation of ERp57 and calreticulin determines the immunogenicity of cell death.* Cell Death Differ, 2008. **15**(9): p. 1499-509.
77. Gardai, S.J., et al., *Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte.* Cell, 2005. **123**(2): p. 321-34.

78. Sebbag, G., et al., *Colon carcinoma in the adolescent.* Pediatr Surg Int, 1997. **12**(5-6): p. 446-8.
79. Faget, J., et al., *Early detection of tumor cells by innate immune cells leads to T(reg) recruitment through CCL22 production by tumor cells.* Cancer Res, 2011. **71**(19): p. 6143-52.
80. Senovilla, L., et al., *An immunosurveillance mechanism controls cancer cell ploidy.* Science, 2012. **337**(6102): p. 1678-84.
81. Miyashita, M., et al., *Prognostic significance of tumor-infiltrating CD8+ and FOXP3+ lymphocytes in residual tumors and alterations in these parameters after neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer: a retrospective multicenter study.* Breast Cancer Res, 2015. **17**: p. 124.
82. DeNardo, D.G., et al., *Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy.* Cancer Discov, 2011. **1**(1): p. 54-67.
83. Demaria, S., et al., *Development of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer after neoadjuvant paclitaxel chemotherapy.* Clin Cancer Res, 2001. **7**(10): p. 3025-30.
84. Loi, S., 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): p. 860-7.
85. Saper, C.B., *Neurobiological basis of fever.* Ann N Y Acad Sci, 1998. **856**: p. 90-4.
86. Ruffell, B., et al., *Leukocyte composition of human breast cancer.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012. **109**(8): p. 2796-2801.
87. Stoll, G., et al., *Immune-related gene signatures predict the outcome of neoadjuvant chemotherapy.* Oncoimmunology, 2014. **3**(1): p. e27884.
88. Disis, M.L., *Immune regulation of cancer.* J Clin Oncol, 2010. **28**(29): p. 4531-8.
89. Pages, F., et al., *Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored.* Oncogene, 2010. **29**(8): p. 1093-102.
90. Ali, H.R., et al., *Computational pathology of pre-treatment biopsies identifies lymphocyte density as a predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer.* Breast Cancer Res, 2016. **18**(1): p. 21.
91. Giesen, C., et al., *Highly multiplexed imaging of tumor tissues with subcellular resolution by mass cytometry.* Nat Methods, 2014. **11**(4): p. 417-22.
92. Gobert, M., et al., *Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome.* Cancer Res, 2009. **69**(5): p. 2000-9.
93. Jung, Y.Y., et al., *Histomorphological Factors Predicting the Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Triple-Negative Breast Cancer.* J Breast Cancer, 2016. **19**(3): p. 261-267.
94. AM, T. and M.-T. SL, *Neoadjuvant treatment of breast cancer.* Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology, 2012. **23 Suppl 10**(Suppl 10).
95. JS, M., V.d.H. JA, and V.d.V. CJ, *Neoadjuvant chemotherapy for operable breast cancer.* The British journal of surgery, 2007. **94**(10).
96. J, H., et al., *Effect of neoadjuvant anthracycline-taxane-based chemotherapy in different biological breast cancer phenotypes: overall results from the GeparTrio study.* Breast cancer research and treatment, 2010. **124**(1).
97. Park, Y.H., et al., *Chemotherapy induces dynamic immune responses in breast cancers that impact treatment outcome.* Nat Commun, 2020. **11**(1): p. 6175.
98. Ringnér, M., *What is principal component analysis?* Nature biotechnology, 2008. **26**(3).

99. Eisenhauer, E.A., et al., *New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1).* Eur J Cancer, 2009. **45**(2): p. 228-47.
100. Thurstone, L.L., *Multiple factor analysis: A development and expansion of vectors of the mind.* 1947: University of Chicago Press, Chicago.
101. Tabachnick, B.F., L., *Principal components and factor analysis. Using multivariate statistics,*. 2001. p. 582-633.
102. Dako. *EnVision Systems | Agilent*. 2022; Available from: https://www.agilent.com/en/product/immunohistochemistry/visualization-systems/envision-flex-systems.
103. Abdel-Fatah, T.M., et al., *HAGE (DDX43) is a biomarker for poor prognosis and a predictor of chemotherapy response in breast cancer.* Br J Cancer, 2014. **110**(10): p. 2450-61.
104. Alhesa, A., et al., *PD-L1 expression in breast invasive ductal carcinoma with incomplete pathological response to neoadjuvant chemotherapy.* International journal of immunopathology and pharmacology, 2022. **36**.
105. Chan, M., et al., *Correlation of tumor-infiltrative lymphocyte subtypes alteration with neoangiogenesis before and after neoadjuvant chemotherapy treatment in breast cancer patients.* The International journal of biological markers, 2014. **29**(3).
106. Dieci, M., et al., *Integration of tumour infiltrating lymphocytes, programmed cell-death ligand-1, CD8 and FOXP3 in prognostic models for triple-negative breast cancer: Analysis of 244 stage I-III patients treated with standard therapy.* European journal of cancer (Oxford, England : 1990), 2020. **136**.
107. Graeser, M., et al., *Immune cell composition and functional marker dynamics from multiplexed immunohistochemistry to predict response to neoadjuvant chemotherapy in the WSG-ADAPT-TN trial.* Journal for immunotherapy of cancer, 2021. **9**(5).
108. Hoffmann, L.G., et al., *Evaluation of PD-L1 and tumor infiltrating lymphocytes in paired pretreatment biopsies and post neoadjuvant chemotherapy surgical specimens of breast carcinoma.* Sci Rep, 2021. **11**(1): p. 22478.
109. Kaewkangsadan, V., et al., *The Differential Contribution of the Innate Immune System to a Good Pathological Response in the Breast and Axillary Lymph Nodes Induced by Neoadjuvant Chemotherapy in Women with Large and Locally Advanced Breast Cancers.* Journal of immunology research, 2017. **2017**.
110. Ladoire, S., et al., *Pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy of breast carcinoma is associated with the disappearance of tumor-infiltrating foxp3+ regulatory T cells.* Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2008. **14**(8).
111. Li, X., et al., *Immune profiling of pre- and post-treatment breast cancer tissues from the SWOG S0800 neoadjuvant trial.* Journal for immunotherapy of cancer, 2019. **7**(1).
112. Liang, H., et al., *TMB and TCR Are Correlated Indicators Predictive of the Efficacy of Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer.* Frontiers in oncology, 2021. **11**.
113. Nadin, S., et al., *Prognostic implication of HSPA (HSP70) in breast cancer patients treated with neoadjuvant anthracycline-based chemotherapy.* Cell stress & chaperones, 2014. **19**(4).
114. Pelekanou, V., et al., *Tumor-Infiltrating Lymphocytes and PD-L1 Expression in Pre- and Posttreatment Breast Cancers in the SWOG S0800 Phase II Neoadjuvant Chemotherapy Trial.* Molecular cancer therapeutics, 2018. **17**(6).
115. Sarradin, V., et al., *Immune microenvironment changes induced by neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancers: the MIMOSA-1 study.* Breast cancer research : BCR, 2021. **23**(1).

116. Urueña, C., et al., *The breast cancer immune microenvironment is modified by neoadjuvant chemotherapy.* Scientific reports, 2022. **12**(1).
117. Varadan, V., et al., *Immune Signatures Following Single Dose Trastuzumab Predict Pathologic Response to PreoperativeTrastuzumab and Chemotherapy in HER2-Positive Early Breast Cancer.* Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2016. **22**(13).
118. Verma, C., et al., *Natural killer (NK) cell profiles in blood and tumour in women with large and locally advanced breast cancer (LLABC) and their contribution to a pathological complete response (PCR) in the tumour following neoadjuvant chemotherapy (NAC): differential restoration of blood profiles by NAC and surgery.* Journal of translational medicine, 2015. **13**.
119. Wang, Y., et al., *Lymphocyte-Activation Gene-3 Expression and Prognostic Value in Neoadjuvant-Treated Triple-Negative Breast Cancer.* Journal of breast cancer, 2018. **21**(2).
120. Wesolowski, R., et al., *Exploratory analysis of immune checkpoint receptor expression by circulating T cells and tumor specimens in patients receiving neo-adjuvant chemotherapy for operable breast cancer.* BMC Cancer, 2020. **20**(1): p. 445.
121. Prado-Garcia, H.R.-G., Susana. Lopez-Gonzalez, Jose Sullivan, *The Role of Exhaustion in Tumor-Induced T Cell Dysfunction in Cancer | SpringerLink.* Cancer Immunology, 2014.
122. Matkowsk, i.R., et al., *The prognostic role of tumor-infiltrating CD4 and CD8 T lymphocytes in breast cancer.* Anticancer research, 2009. **29**(7).
123. Stovgaard, E.S., et al., *Triple negative breast cancer - prognostic role of immune-related factors: a systematic review.* Acta Oncol, 2018. **57**(1): p. 74-82.
124. Laplane, L., et al., *The Multiple Layers of the Tumor Environment.* Trends in cancer, 2018. **4**(12).
125. McAllister, S. and R. Weinberg, *The tumour-induced systemic environment as a critical regulator of cancer progression and metastasis.* Nature cell biology, 2014. **16**(8).
126. Nalio Ramos, R., et al., *Tissue-resident FOLR2(+) macrophages associate with CD8(+) T cell infiltration in human breast cancer.* Cell, 2022. **185**(7): p. 1189-1207 e25.
127. L, L., et al., *Beyond the tumour microenvironment.* International journal of cancer, 2019. **145**(10).
128. Bernal-Estévez, D.A., et al., *Monitoring the responsiveness of T and antigen presenting cell compartments in breast cancer patients is useful to predict clinical tumor response to neoadjuvant chemotherapy*, in *BMC Cancer*. 2018.
129. Bunt, S.K., et al., *Reduced inflammation in the tumor microenvironment delays the accumulation of myeloid-derived suppressor cells and limits tumor progression.* Cancer Res, 2007. **67**(20): p. 10019-26.
130. Solito, S., et al., *Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity in human cancers.* Ann N Y Acad Sci, 2014. **1319**: p. 47-65.
131. DG, D., et al., *Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy.* Cancer discovery, 2011. **1**(1).
132. Ceprnja, T., et al., *Prognostic Significance of Lymphocyte Infiltrate Localization in Triple-Negative Breast Cancer.* J Pers Med, 2022. **12**(6).
133. Gu-Trantien, C., et al., *CXCL13-producing TFH cells link immune suppression and adaptive memory in human breast cancer.* JCI insight, 2017. **2**(11).
134. Buisseret, L., et al., *Tumor-infiltrating lymphocyte composition, organization and PD-1/ PD-L1 expression are linked in breast cancer.* Oncoimmunology, 2017. **6**(1): p. e1257452.

135. Salgado, R., et al., *The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014.* Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology, 2015. **26**(2).
136. Shiroo, M., et al., *CD45 tyrosine phosphatase-activated p59fyn couples the T cell antigen receptor to pathways of diacylglycerol production, protein kinase C activation and calcium influx.* The EMBO journal, 1992. **11**(13).
137. Liu, J., et al., *New insights into M1/M2 macrophages: key modulators in cancer progression.* Cancer Cell Int, 2021. **21**(1): p. 389.
138. Hwang, I., et al., *Tumor-associated macrophage, angiogenesis and lymphangiogenesis markers predict prognosis of non-small cell lung cancer patients.* J Transl Med, 2020. **18**(1): p. 443.
139. Pan, Y., et al., *Tumor-Associated Macrophages in Tumor Immunity.* Frontiers in immunology, 2020. **11**.
140. Dumitru, C.A., et al., *Neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: immunophenotyping, cell biology and clinical relevance in human oncology.* Cancer Immunol Immunother, 2012. **61**(8): p. 1155-67.
141. Li, Y.W., et al., *Intratumoral neutrophils: a poor prognostic factor for hepatocellular carcinoma following resection.* J Hepatol, 2011. **54**(3): p. 497-505.
142. Sznurkowski, J.J., A. Zawrocki, and W. Biernat, *Subtypes of cytotoxic lymphocytes and natural killer cells infiltrating cancer nests correlate with prognosis in patients with vulvar squamous cell carcinoma.* Cancer Immunol Immunother, 2014. **63**(3): p. 297-303.
143. Roberti, M.P., J. Mordoh, and E.M. Levy, *Biological role of NK cells and immunotherapeutic approaches in breast cancer.* Front Immunol, 2012. **3**: p. 375.
144. Rajjoub, S., et al., *Prognostic significance of tumor-infiltrating lymphocytes in oropharyngeal cancer.* Ear Nose Throat J, 2007. **86**(8): p. 506-11.
145. Ancuta, E., et al., *Predictive value of cellular immune response in cervical cancer.* Rom J Morphol Embryol, 2009. **50**(4): p. 651-5.
146. Sinicrope, F.A., et al., *Intraepithelial effector (CD3+)/regulatory (FoxP3+) T-cell ratio predicts a clinical outcome of human colon carcinoma.* Gastroenterology, 2009. **137**(4): p. 1270-9.
147. Matsumoto, H., et al., *Increased CD4 and CD8-positive T cell infiltrate signifies good prognosis in a subset of triple-negative breast cancer.* Breast Cancer Res Treat, 2016. **156**(2): p. 237-47.
148. Sato, E., et al., *Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(51): p. 18538-43.
149. Zeestraten, E.C., et al., *FoxP3- and CD8-positive Infiltrating Immune Cells Together Determine Clinical Outcome in Colorectal Cancer.* Cancer Microenviron, 2013. **6**(1): p. 31-9.
150. Bernal-Estévez, D., et al., *Chemotherapy and radiation therapy elicits tumor specific T cell responses in a breast cancer patient.* BMC cancer, 2016. **16**.
151. Bernal-Estévez, D., et al., *Autologous Dendritic Cells in Combination With Chemotherapy Restore Responsiveness of T Cells in Breast Cancer Patients: A Single-Arm Phase I/II Trial.* Frontiers in immunology, 2021. **12**.
152. Lalinde-Ruiz, N., et al., *Young but not older adults exhibit an expansion of CD45RA+CCR7+CD95+ T follicular helper cells in response to tetanus vaccine.* Experimental gerontology, 2021. **156**.

153. Kallies, A., D. Zehn, and D.T. Utzschneider, *Precursor exhausted T cells: key to successful immunotherapy?* Nat Rev Immunol, 2020. **20**(2): p. 128-136.
154. Teft, W.A., M.G. Kirchhof, and J. Madrenas, *A molecular perspective of CTLA-4 function.* Annu Rev Immunol, 2006. **24**: p. 65-97.
155. S, O.-R., H. LA, and H. ST, *The programmed death-1 immune-suppressive pathway: barrier to antitumor immunity.* Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 2014. **193**(8).
156. Dong, H., et al., *Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion.* Nat Med, 2002. **8**(8): p. 793-800.
157. Flemming, A., *Cancer: PD1 makes waves in anticancer immunotherapy.* Nat Rev Drug Discov, 2012. **11**(8): p. 601.
158. Woo, S.R., et al., *Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape.* Cancer Res, 2012. **72**(4): p. 917-27.
159. Foy, S.P., et al., *Poxvirus-Based Active Immunotherapy with PD-1 and LAG-3 Dual Immune Checkpoint Inhibition Overcomes Compensatory Immune Regulation, Yielding Complete Tumor Regression in Mice.* PLoS One, 2016. **11**(2): p. e0150084.
160. Chan, J.D., et al., *Cellular networks controlling T cell persistence in adoptive cell therapy.* Nat Rev Immunol, 2021. **21**(12): p. 769-784.
161. Li, L., et al., *Effects of immune cells and cytokines on inflammation and immunosuppression in the tumor microenvironment.* Int Immunopharmacol, 2020. **88**: p. 106939.
162. King, J., H. Mir, and S. Singh, *Association of Cytokines and Chemokines in Pathogenesis of Breast Cancer.* Prog Mol Biol Transl Sci, 2017. **151**: p. 113-136.
163. Nagarsheth, N., M.S. Wicha, and W. Zou, *Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy.* Nat Rev Immunol, 2017. **17**(9): p. 559-572.
164. Pillemer, B.B., et al., *STAT6 activation confers upon T helper cells resistance to suppression by regulatory T cells.* J Immunol, 2009. **183**(1): p. 155-63.