



Cel·lularitat immune als ganglis limfàtics axil·lars negatius en pacients amb càncer de mama

Ramon Bosch Príncipe

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

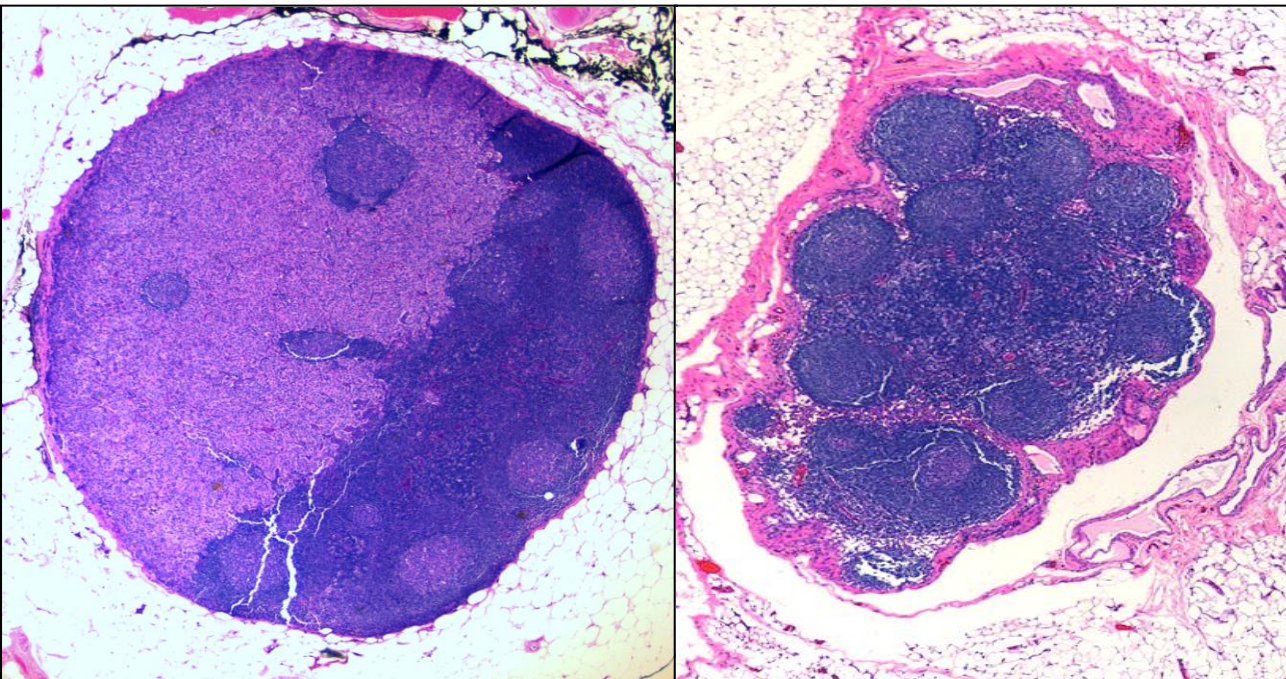
WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

Cel·lularitat immune als ganglis limfàtics axil·lars negatius en pacients amb càncer de mama

RAMON BOSCH PRÍNCEP



TESI DOCTORAL
2020

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Cel·lularitat immune als ganglis limfàtics axil·lars negatius en pacients amb càncer de mama

Ramon Bosch Princep

Més val tard que mai

Diògenes Laerci

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Cel·lularitat immune als ganglis limfàtics axil·lars negatius en pacients amb càncer de mama

Ramon Bosch Princep

Ramon Bosch Príncep

Cel·lularitat immune
als ganglis limfàtics axil·lars negatius
en pacients amb càncer de mama.

TESI DOCTORAL

Directors: Dr. Carlos López Pablo
Dra. Marylène Lejeune

Departament de Medicina i Cirurgia



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Tortosa
2020

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Cel·lularitat immune als ganglis limfàtics axil·lars negatius en pacients amb càncer de mama

Ramon Bosch Princep



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FAIG CONSTAR que aquest treball, titulat "Cel·lularitat immune als ganglis limfàtics axil·lars negatius en pacients amb càncer de mama", que presenta Ramon Bosch Príncep per a l'obtenció del títol de Doctor, ha estat realitzat sota la meva direcció al Departament de Medicina i Cirurgia d'aquesta universitat.

Tortosa, 7 de juliol de 2020

El/s director/s de la tesi doctoral

Dr. Carlos López Pablo

Dra. Marylène Lejeune

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Cel·lularitat immune als ganglis limfàtics axil·lars negatius en pacients amb càncer de mama

Ramon Bosch Princep

Agraïments

Els projectes de recerca, com aquesta tesi doctoral, requereixen sovint molta dedicació i esforç i fan necessari que tot un equip treballi unit i coordinat per poder-los tirar endavant. És per això que vull donar gràcies a les persones que d'alguna manera han fet possible aquesta tesi doctoral.

Primer que tot vull agrair a la Marisa, la Laura i la Marta per la seva paciència i comprensió que han tingut i segueixen tenint i, a les qui he robat moltes hores per poder dedicar-me a activitats científiques com les relacionades amb aquesta tesi doctoral o senzillament relacionades amb el dia a dia del meu treball com a patòleg. D'altra banda també estic en deute amb els meus pares i germans que sense dubtes han marcat, de forma conscient o inconscient, el meu camí cap a la medicina i cap a la recerca.

Carlos i Marylène, els meus directors, són els que mantenen viva la recerca al Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital de Tortosa Verge de la Cinta (HTVC), des de fa molts anys. Ells lideren el grup de Recerca de Patologia Oncològica i Bioinformàtica del nostre hospital. Sense la seva capacitat, tenacitat i suport incondicional aquesta tesi doctoral no s'hagués pogut desenvolupar.

Tot aquest treball tampoc hagués estat possible sense l'esforç de molta gent del servei d'Anatomia Patològica de l'HTVC, en especial vull donar gràcies a Bàrbara, la Coordinadora de TEAPs, que juntament amb la resta de tècnics d'Anatomia Patològica, sempre estan disposats a ajudar, fent qualsevol tècnica o qualsevol tasca, i sempre amb un somriure entre les dents. No puc tampoc oblidar-me dels meus companys patòlegs, en especial de Ximo, no només perquè ha estat el meu

company de feina durant més de 20 anys, el meu consultor en patologia mamària durant la major part d'aquest temps i el que va obrir aquesta línia de recerca, sinó també perquè em va ajudar a seleccionar les àrees dels càncer de mama i ganglionars que hem estudiat en aquesta tesi.

Em cal també agrair als membres del comitè de mama de l'HTVC que amb el seu treball diari han contribuït al fet que hi hagi una sèrie de pacients perfectament estudiades i seguides, el que ha facilitat la recollida de dades clíniques d'aquesta tesi.

Més enllà d'aquest treball de tesi, vull també donar gràcies al Juanjo perquè, amb l'alegria, claredat i dinamisme amb què ens explicava l'assignatura d'anatomia patològica a la facultat, em va convèncer, com a tants altres, per ser alumne intern d'aquesta assignatura, fet que va convertir aquesta especialitat en una passió per a mi i que l'escollís al MIR. També he tingut molta sort de tenir a l'August com a company de carrera i d'especialitat, ja que encara ara mantenim una molt bona relació d'amistat i professional. No vull tampoc deixar de recordar a la gent del Servei d'Anatomia Patològica de la Vall d'Hebron que durant el meu període de formació MIR, els anys del 91 al 94, em van ensenyar i educar amb intensitat en aquesta especialitat. Tampoc vull deixar de nomenar als patòlegs de l'Hospital de Bellvitge als qui de forma permanent els enviem casos de consulta i que sempre ens ajuden d'una forma desinteressada.

Espero que aquesta tesi doctoral serveixi com a punt de partida de més tesis doctorals portades a terme al servei d'Anatomia Patològica de l'HTVC i també desitjo que aquests esforços en recerca hagin aportat millores en el diagnòstic anatomopatològic del dia a dia d'aquest servei.



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI



FUNDACIÓ DOCTOR FERRAN

CEL·LULARITAT IMMUNE ALS GANGLIS AXIL·LARS NEGATIUS

DE PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA



INSTITUT
D'INVESTIGACIÓ
SANITÀRIA
PERE VIRGILI



Hospital de Tortosa
Verge de la Cinta

ÍNDEX

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Cel·lularitat immune als ganglis limfàtics axil·lars negatius en pacients amb càncer de mama

Ramon Bosch Príncep



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI



FUNDACIÓ DOCTOR FERRAN

CEL·LULARITAT IMMUNE ALS GANGLIS AXIL·LARS NEGATIUS

DE PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA



INSTITUT D'INVESTIGACIÓ SANITÀRIA PERE VIRGILI

HTVC

Hospital de Tortosa
Verge de la Cinta

Índex

Llista de publicacions	1
Abreviacions i acrònims	3
RESUM	9
1. ANTECEDENTS	15
1.1. Incidència i mortalitat del càncer de mama	15
1.2. Factors pronòstics clinicopatològics i biomarcadors del càncer de mama	15
1.3. Drenatge limfàtic i ganglis limfàtics de la glàndula mamària	16
1.4. Implicacions pronòstiques de la metàstasi ganglionar	17
1.5. El tumor primari, els ganglis limfàtics i el sistema immunitari.	19
1.6. Càncer de mama i cel·lularitat immunitària.	22
1.6.1. Limfòcits en el càncer de mama	24
1.6.2. Macròfags en el càncer de mama	29
1.6.3. Cèl·lules dendrítiques en el càncer de mama	32
1.6.4. Altres cèl·lules immunes en el càncer de mama	34
1.6.5. Resum del paper de les cèl·lules immunes en el càncer de mama	35
1.7. Fonaments científicotècnics de l'estudi	37
2. HIPÒTESI	41
3. OBJECTIUS	45
4. MÈTODES	49
4.1. Disseny de l'estudi i selecció de participants	49
4.2. Dades clinicopatològiques i avaluació de la cel·lularitat immune	51
4.3. Digitalització de les matrius multiteixit	54
4.4. Anàlisi digital de les mostres	56
4.5. Variables	57



4.6. Anàlisi estadístic _____	59
5 . RESULTATS _____	63
5.1. Diferències clinicopatològiques _____	63
5.2. Diferències en la cel·lularitat immune _____	63
5.3. Models de regressió logística _____	65
5.4. Models predictius i assignació de pacients als grups diagnosticats _____	69
5.5. Models predictius i evolució de les pacients _____	71
5.6. Desenvolupament del model i efectes secundaris d'una classificació incorrecta _____	78
6. DISCUSSIÓ _____	83
7. CONCLUSIÓ _____	91
8. BIBLIOGRAFIA _____	97

Llista de publicacions

Els resultats presentats en aquesta tesi han estat publicats en les següents revistes (primers autors a parts iguals*):

1. Lopez C*, **Bosch R***, Orero G, Korzynska A, Garcia-Rojo M, Bueno G, et al. The Immune Response in Nonmetastatic Axillary Lymph Nodes Is Associated with the Presence of Axillary Metastasis and Breast Cancer Patient Outcome. *Am J Pathol.* 2020; 190(3):660-673. PMID: 31866348. Factor d'impacte 3,491 – quartil 1 (Pathology).
2. Gibert-Ramos A, Lopez C, **Bosch R**, Fontoura L, Bueno G, Garcia-Rojo M, et al. Immune response profile of primary tumour, sentinel and non-sentinel axillary lymph nodes related to metastasis in breast cancer: an immunohistochemical point of view. *Histochemistry and Cell Biology.* 2019;152(3):177-93. PMID: 31300877. Factor d'impacte 3,418 – decil 1 (Microscopy).



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI



FUNDACIÓ DOCTOR FERRAN

CEL·LULARITAT IMMUNE ALS GANGLIS AXIL·LARS NEGATIUS

DE PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA



ISP
INSTITUT
D'INVESTIGACIÓ
SANITÀRIA
PERE VIRGILI

HTVC

Hospital de Tortosa
Verge de la Cinta

Abreviacions i acrònims

APC	Cèl·lula presentadora d'antigen (en anglès: Antigen-Presenting Cell)
AUC	Àrea sota la corba (en anglès: Area Under de Curve)
CI	Interval de confiança (en anglès: Confidence Interval)
CM	Càncer de mama
CSS	Supervivència específica de càncer (en anglès: Cancer Specific Survival)
CTL	Limfòcits T citotòxics (en anglès: Cytotoxic T Lymphocytes)
DAB	3,3'-Diaminobenzidina
DC	Cèl·lules dendrítiques (en anglès: Dendritic Cells)
DFS	Supervivència lliure de malaltia (en anglès: Disease Free Survival)
GL	Gangli limfàtic
GLA	Gangli limfàtic axil·lar
GLA ⁻	Gangli limfàtic axil·lar sense metàstasi al diagnòstic
GLA ⁺	Gangli limfàtic axil·lar amb metàstasi al diagnòstic
GLS	Gangli limfàtic sentinella
HE	Hematoxilina-Eosina
HER2	Receptor 2 del factor de creixement epidèrmic humà (en anglès: Human Epidermal Growth Factor Receptor 2)
IDO	Indoleamina-2, 3-dioxigenasa
IHQ	Immunohistoquímica
LVI	Invasió limfovascular (en anglès: Lymphovascular Invasion)

- LAMP3 Glicoproteïna de membrana 3 associada al lisosoma (en anglès: Lysosome-Associated Membrane Glycoprotein 3)
- MHC Complex major d'histocompatibilitat (en anglès: Major Histocompatibility Complex)
- NK Cèl·lules assassines naturals o cèl·lules NK (en anglès: Natural Killers)
- OR Oportunitat relativa (en anglès: Odds ratio)
- OS Supervivència global (en anglès: Overall survival)
- PD1 Receptor 1 de mort programada (en anglès: Programmed Death-1)
- PD-L1 Lligand 1 de mort programada (en anglès: Programmed Death-Ligand 1)
- pDC Cèl·lules dendrítiques plasmocitoides (en anglès: Plasmacytoid dendritic cells)
- pdGLA⁻ Pacients diagnosticades de CM amb GLA⁻
- pdGLA⁺ Pacients diagnosticades de CM amb GLA⁺
- PNI Invasió perineural (en anglès: Perineural Invasion)
- ppGLA⁻ Pacients predites pels models com pacients amb GLA⁻
- ppGLA⁺ Pacients predites pels models com pacients amb GLA⁺
- RE Receptor d'estrògens
- ROC Característica operativa del receptor (en anglès: Receiver Operating Characteristic)
- RP Receptor de progesterona
- TAMs Macròfags associats al tumor (en anglès: Tumor Associated Macrophages)
- TAN Neutròfils associats al tumor (en anglès: Tumor Associated Neutrophils)

- Th Limfòcits T col·laboradors (en anglès: T helper)
- TILs Limfòcits que infiltren el tumor (en anglès: Tumor Infiltrating Lymphocytes)
- TMA Matriu multiteixit (en anglès: Tissue Microarrays)
- TN Triple negatiu
- TTP Temps fins a la progressió (en anglès: Time To Progression)
- VEGF-C Factors de creixement endotelial vascular C (en anglès: Vascular Endothelial Growth Factor C)
- VEGF-D Factors de creixement endotelial vascular D (en anglès: Vascular Endothelial Growth Factor D)
- WSI portaobjectes virtuals (en anglès Whole Slide Imaging)



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI



FUNDACIÓ DOCTOR FERRAN

CEL·LULARITAT IMMUNE ALS GANGLIS AXIL·LARS NEGATIUS

DE PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA



INSTITUT D'INVESTIGACIÓ SANITÀRIA PERE VIRGILI



Hospital de Tortosa Verge de la Cinta



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI



FUNDACIÓ DOCTOR FERRAN

CEL·LULARITAT IMMUNE ALS GANGLIS AXIL·LARS NEGATIUS

DE PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA



INSTITUT
D'INVESTIGACIÓ
SANITÀRIA
PERE VIRGILI



Hospital de Tortosa
Verge de la Cinta

RESUM



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI



FUNDACIÓ DOCTOR FERRAN

CEL·LULARITAT IMMUNE ALS GANGLIS AXIL·LARS NEGATIUS

DE PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA



INSTITUT
D'INVESTIGACIÓ
SANITÀRIA
PERE VIRGILI

HTVC

Hospital de Tortosa
Verge de la Cinta

RESUM

Antecedents: En càncer de mama (CM) és ben conegut que les cèl·lules tumorals poden modificar la resposta immune del mateix tumor primari però també la resposta immune dels ganglis limfàtics amb metàstasi, influint en l'evolució clínica del pacient. Per contra, es coneix molt poc sobre com el CM pot influir en la cel·lularitat immune dels ganglis limfàtics sense metàstasi.

Objectius: Avaluar els patrons de cel·lularitat immune al tumor primari i als ganglis limfàtics axil·lars sense metàstasi (GLA⁻) i determinar si aquests patrons de cel·lularitat immune són diferents entre les pacients diagnosticades de CM que tenen metàstasi en ganglis axil·lars (pdGLA⁺) i les pacients diagnosticades de CM sense metàstasi axil·lars (pdGLA⁻). Es pretén també investigar si aquestes diferències poden contribuir a una evolució clínica diferent de les pacients.

Material i mètodes: Es van estudiar mitjançant immunohistoquímica (IHQ) 11 poblacions cel·lulars immunes diferents implicades en la resposta immune tissular antitumoral, usant matrius multiteixit i anàlisi digital d'imatges, sobre mostres histològiques de 141 pacients amb CM (75 pdGLA⁺ i 66 pdGLA⁻). Es va avaluar si els diferents patrons de cel·lularitat immune, a nivell intratumoral i en els GLA⁻, es trobaven associats a la presència de ganglis axil·lars metastàtics (GLA⁺) al diagnòstic. Es van construir dos models de regressió logística per identificar les variables clíniques, patològiques i immunològiques associades a la presència de GLA⁺ al diagnòstic. Es van utilitzar els models per intentar predir quines pacients



podien tenir o no GLA⁺ al diagnòstic. Es van comparar les diferències en la supervivència entre les pdGLA⁻, les pdGLA⁺ i també les diferències en la supervivència entre les pacients que van ser predites pels models de regressió com GLA⁻ (ppGLA⁻) i les predites com GLA⁺ (ppGLA⁺).

Resultats: L'estudi comparatiu dels dos grups de pacients va mostrar diferències significatives en les variables clinicopatològiques on les pdGLA⁺ tenien tumors significativament més grans, percentatges més alts d'invasió limfovascular i perineural, i un grau histològic més alt que les pdGLA⁻, com era d'esperar. Quant a la comparativa de la cel·lularitat immune entre els dos grups de pacients, no es van trobar diferències significatives en el tumor primari, tret d'una major densitat de cèl·lules dendrítiques (DC) fol·liculars CD21⁺ en les pdGLA⁺. D'altra banda, en el GLA⁻, sí que es van detectar diferències significatives en el patró de cel·lularitat immune entre els dos grups de pacients; concretament es va evidenciar una major densitat de limfòcits T CD8⁺, de macròfags CD68⁺ i de DC interdigitants S100⁺ i una menor densitat de DC plasmocitoides CD123⁺ en les pdGLA⁺ respecte a les pdGLA⁻. Respecte als dos models de regressió desenvolupats, el segon va incloure el diàmetre i tres poblacions immunes dels GLA⁻ associades a la presència de GLA⁻. Al utilitzar els models per fer prediccions, es va posar de manifest que en el segon model hi havia un petit subgrup de pdGLA⁺ que havien estat incorrectament predites per aquests models com ppGLA⁻ i que encara que tenien GLA⁺ tenien una supervivència més similar a les pdGLA⁻. A la inversa, es va trobar també un altre petit subgrup de pdGLA⁻ que foren classificades erròniament pels models com



ppGLA⁺ encara que no tenien cap GLA⁺ al diagnòstic, però que va tenir una supervivència i progressió de la malaltia més similar a la de les pdGLA⁺.

Conclusions: Al contrari del que succeeix en el tumor primari, sí que s'han pogut demostrar diferències importants en el patró de cel·lularitat immune dels GLA⁻ entre les pdGLA⁺ i pdGLA⁻. A més a més, algunes poblacions d'aquesta cel·lularitat immune del GLA⁻ estan fortament associades al fet de tenir metàstasi en el GLA al diagnòstic. Finalment les nostres dades suggereixen també que el patró de cel·lularitat immune present en els GLA⁻ al diagnòstic podria estar relacionat amb la diferent evolució clínica i supervivència de les pacients amb CM.

Paraules clau: càncer de mama; gangli limfàtic axil·lar, metàstasi axil·lar; resposta immune, cel·lularitat immune, immunohistoquímica, cèl·lules dendrítiques.



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI



FUNDACIÓ DOCTOR FERRAN

CEL·LULARITAT IMMUNE ALS GANGLIS AXIL·LARS NEGATIUS

DE PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA



ISP
INSTITUT
D'INVESTIGACIÓ
SANITÀRIA
PERE VIRGILI

HTVC

Hospital de Tortosa
Verge de la Cinta



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI



FUNDACIÓ DOCTOR FERRAN

CEL·LULARITAT IMMUNE ALS GANGLIS AXIL·LARS NEGATIUS

DE PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA



ANTECEDENTS



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI



FUNDACIÓ DOCTOR FERRAN

CEL·LULARITAT IMMUNE ALS GANGLIS AXIL·LARS NEGATIUS

DE PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA



ISP
INSTITUT
D'INVESTIGACIÓ
SANITÀRIA
PERE VIRGILI



Hospital de Tortosa
Verge de la Cinta

1. ANTECEDENTS

1.1. Incidència i mortalitat del càncer de mama

El **càncer** és la segona causa de mort en l'àmbit mundial.¹ Es calcula que l'any 2012 es van diagnosticar 14,1 milions de casos nous de càncer i es van produir 8,2 milions de morts al món,² augmentant aquesta mortalitat per càncer fins als 9,6 milions el 2018.¹ El càncer més freqüent en dones és el **càncer de mama** (CM), que va suposar aproximadament el 15% de totes les morts per càncer del 2018.¹ S'estima que el 12,4% de les dones seran diagnosticades de CM al llarg de la seva vida.³

1.2. Factors pronòstics clinicopatològics i biomarcadors del càncer de mama

Els factors **pronòstics clinicopatològics** estàndards de les pacients amb CM són l'edat, l'estadiatge, el grau histològic, el tipus histològic, l'estat dels marges i la invasió limfovascular (LVI: en anglès Lymphovascular Invasion).⁴ Altres marcadors estàndards predictius i/o pronòstics requerits per al maneig clínic de les pacients són els receptors hormonals d'estrogen (RE) i de progesterona (RP), i l'estatus del gen del receptor 2 del factor de creixement epidèrmic humà (HER2: en anglès Human Epidermal Growth Factor Receptor 2). El marcador de proliferació cel·lular Ki67 fa ja bastant temps que es va incorporar també a la rutina diagnòstica.

Des de fa alguns anys es coneix també que el **CM és heterogeni a nivell molecular** amb diferents patrons d'expressió gènica que comporten diferències en el comportament clínic i pronòstic.^{5,6} A causa de les dificultats per fer aquest tipus

d'estudis, pel seu cost econòmic i de temps, s'està utilitzant en la clínica diària una **classificació molecular subrogada** que s'obté a partir de les dades immunohistoquímiques i d'hibridació in situ (RE, RP, Ki67 i HER2), que és la que determina la majoria dels tractaments actuals del CM i que permet classificar-los principalment com Luminal A, Luminal B, HER2⁺ i Triple Negatiu (TN).^{4,7} En el moment actual s'estan introduint a la rutina plataformes que estudien el perfil genòmic del CM (fenotip molecular) per decidir si algunes pacients es beneficiaran o no de quimioteràpia, especialment en pacients amb CM amb RE positius, HER2 negatiu i amb ganglis limfàtics axil·lars sense metastasi al diagnòstic (GLA).⁸ En els darrers anys també són punt d'intensa investigació científica per definir el seu valor com a biomarcadors, la cel·lularitat immune intratumoral, el limfòcits que infiltrin el tumor (TIL: en anglès Tumor Infiltrating Lymphocytes), el lligand 1 de la mort programada (PD-L1: en anglès Programmed Death-ligand 1) o les cèl·lules tumorals circulants en sang entre altres.^{8,9}

1.3. Drenatge limfàtic i ganglis limfàtics de la glàndula mamària

El drenatge limfàtic normal de tota la glàndula mamària es produeix majoritàriament als **ganglis limfàtics axil·lars (GLA)**, però en un 36% de les dones aquest drenatge s'identifica també a altres cadenes ganglionars, més freqüentment a la cadena mamària interna¹⁰ i molt més rarament als ganglis infraclaviculars, supraclaviculars i els interpectorals (Figura 1). Així la probabilitat que en condicions normals existeixi un drenatge limfàtic a les cadenes axil·lar, mamària interna, infraclavicular, supraclavicular i interpectorals és respectivament del 98,2%, 35,3%, 1,7%, 3,1% i 0,7%.¹⁰

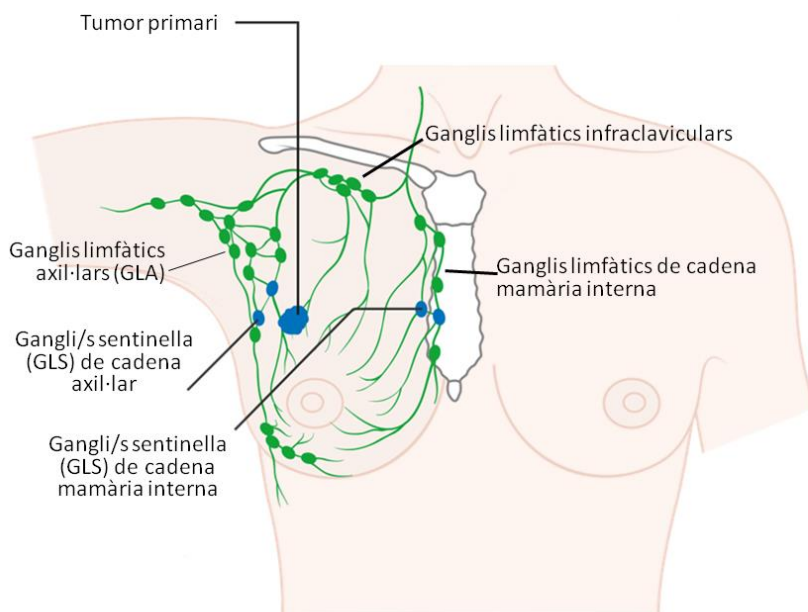


Des de fa més de 20 anys es coneix l'existència del **gangli limfàtic sentinella** (GLS). El GLS és el primer gangli limfàtic (GL) que rep el drenatge limfàtic d'un tumor i el seu estudi s'ha imposat en el maneig del melanoma, del CM, del carcinoma en la vulva i del carcinoma de cèrvix uterí.¹¹ En el CM, el GLS també és el primer GL a rebre les metàstasis del carcinoma¹² (Figura 1) i, la seva localització (mapatge majoritàriament amb un radiotracador) i biòpsia selectiva s'ha anat incorporant de forma progressiva al maneig rutinari del CM, el que ha suposat un gran avenç per la disminució de la morbiditat, ja que evita moltes limfadenectomies axil·lars, al mateix temps que la seva identificació selectiva permet un estudi anatomopatològic més precís del gangli i disminueix el nombre de falsos negatius.¹¹ En les pacients amb CM primari, la identificació intraoperatòria del GLS és produeix en el 97% dels pacients i el drenatge limfàtic s'observa cap als GLA ipsilaterals en el 96% del casos, i en un petit estudi el drenatge s'observa en un 22% cap la cadena mamària interna, un 7% cap a ganglis intramamaris, un 2% subclaviculars, un 0,5% supraclaviculars i un 2% interpectorals.^{13,14}

1.4. Implicacions pronòstiques de la metàstasi ganglionar

L'**afectació dels GL** és un dels factors pronòstics més important en el CM i aquesta afectació és determinant per al seu maneig.¹⁵ La principal causa de mort en pacients amb CM és la metàstasi a distància i els GL són la porta principal per a la disseminació de les cèl·lules tumorals del tumor primari cap a altres regions del cos.^{16,17} Dos terços de les pacients amb ganglis axil·lars amb metàstasi al diagnòstic (GLA⁺) desenvoluparan metàstasis a distància en els 10 anys següents al diagnòstic.¹⁸ A més a més, aproximadament el 6% de les pacients amb CM

presenten metàstasis a distància al moment del diagnòstic¹⁶ el que comporta que aquesta malaltia sigui incurable¹⁹ i que el 73% d'aquestes dones morin en els cinc anys posteriors al diagnòstic.³ Aquesta baixa taxa de supervivència de les pacients amb càncer metastàtic posa de manifest la necessitat de comprendre els mecanismes que condueixen a la disseminació del CM tant als GL regionals (metàstasis locoregionals) com a les regions distals (metàstasis a distància).



Modificat de: Cancer Research UK / CC BY-SA (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>)

Figura 1. Representació gràfica d'un càncer de mama i dels diferents ganglis limfàtics sentinella i els principals territoris ganglionars de drenatge limfàtic d'aquest.



1.5. El tumor primari, els ganglis limfàtics i el sistema immunitari.

Els tumors són teixits complexos compostos no només de cèl·lules tumorals, sinó també de tot un “microambient tumoral” que està sent el focus d’atenció de molts científics.²⁰⁻²² Dintre d’aquest microambient tumoral es troben **les cèl·lules immunes** que constitueixen la base de la resposta immune, que des de fa molt temps es coneix que juga un paper fonamental enfront de la progressió del càncer, detectant i eliminant les cèl·lules tumorals i, per tant, frenant el creixement del tumor.²³⁻²⁶ De totes maneres, també des de fa alguns anys coneixem que les mateixes cèl·lules tumorals poden inhibir o inclús aprofitar en benefici propi aquesta resposta immune de l’hoste, ja sigui mitjançant l’activació de vies reguladores específiques relacionades que inhibeixen la resposta immune antitumoral, desenvolupant característiques per evitar el reconeixement per les cèl·lules immunes o usant altres mecanismes.²⁷⁻²⁹ Aquesta capacitat que tenen les cèl·lules tumorals d’evadir el reconeixement i la destrucció immune pels limfòcits T i B, macròfags i cèl·lules assassines naturals o cèl·lules NK (NK: en anglès Natural Killers) són característiques fonamentals que permeten el creixement d’aquestes cèl·lules tumorals i les seves metàstasis.^{26,30}

Els GL són centres crucials per al desenvolupament d’una resposta immune antitumoral eficaç i l’estudi de l’estat immunològic del GL pot, ser tan important com la identificació de determinades característiques de les mateixes cèl·lules tumorals.³¹ D’altra banda es coneix bé que les cèl·lules tumorals i les molècules, que aquestes secreten, retenen cèl·lules limfoides, mieloides i estromals, no només en l’interior del tumor primari sinó també en el sistema limfàtic, disminuint

la immunitat antitumoral i promocionant el creixement tumoral.³²

Les anàlisis histopatològiques proporcionen evidència de la presència de diferents cèl·lules immunes en la majoria dels tumors humans, les quals, des del punt de vista funcional, es poden dividir en dos grups: **les cèl·lules del sistema immune innat i les del sistema immune adaptatiu.**³³

La **immunitat innata o natural** és aquella que es posa en marxa en primer lloc i de forma ràpida, després de l'enfrontament de l'antigen amb les cèl·lules immunes. A aquest grup del sistema immune innat pertanyen les cèl·lules NK, els macròfags i les cèl·lules dendrítiques (DC: en anglès Dendritic Cells). Les **cèl·lules NK** són cèl·lules immunes amb una activitat citolítica ràpida i potent en resposta a la presència de cèl·lules transformades. Aquestes tenen una àmplia gamma de receptors inhibidors i estimuladors a la superfície cel·lular que s'utilitzen per a la vigilància immune.³⁴ Els **macròfags** provenen de la diferenciació dels monòcits circulants després d'haver infiltrat els teixits i en diferenciar-se són capaços de detectar i respondre a lesions tissulars, jugant un paper clau en l'homeòstasi i reparació tissular.³⁵ Les **DC**, com a interfície entre la immunitat innata i l'adaptativa, són cèl·lules especialitzades que presenten antígens (APC: en anglès Antigen-Presenting Cell) endògens i exògens a cèl·lules T en presència del complex major d'histocompatibilitat (MHC: en anglès Major Histocompatibility Complex). Existeixen diferents tipus de DC que infiltren els tumors, i la seva activitat és necessària per explicar el paper de les cèl·lules T i la seva participació en la progressió del càncer ha quedat clarament demostrada a la bibliografia.^{23,36-38}



El **sistema immunitari adaptatiu**, al contrari que l'innat, es posa en marxa més lentament i detecta, d'una forma més específica, les cèl·lules estranyes mitjançant el reconeixement de proteïnes no pròpies (víriques o tumorals) o antígens propis que poden estar mutats o inapropiadament expressats. Després **d'eliminar aquests antígens**, es mantenen indefinidament algunes cèl·lules de memòria el que proporciona una immunitat duradora. Per limitar el dany tissular ocasionat per aquesta resposta immune en aquelles situacions on els antígens no poden ser eliminats (ex. inflamacions cròniques) existeixen mecanismes immunològics de **tolerància**. Les cèl·lules implicades en aquest sistema immunitari adaptatiu són tant els limfòcits T com els B i des d'un punt de vista morfològic aquestes es corresponen majoritàriament amb els anomenats TIL.⁹

Les **cèl·lules T** són limfòcits que actuen com a orquestradors i efectors de la immunitat i depenent del context immunològic poden adquirir diferents fenotips funcionals i la seva activitat pot tenir una funció proinflamatòria o antiinflamatòria. Les cèl·lules T **CD8⁺** són les cèl·lules antitumorals més destacades. Després de la iniciació i l'activació per les APCs, les cèl·lules T CD8⁺ es diferencien en **limfòcits T citotòxics** (CTL: en anglès Cytotoxic T Lymphocytes) i, mitjançant l'exocitosis de grànuls que contenen perforina i granzim, exerceixen un atac antitumoral eficient. D'altra banda les cèl·lules T **CD4⁺** col·laboradores (Th: en anglès T helper), es poden diferenciar en dues classes diferents (**Th1 o Th2**) depenent de les citocines específiques que les cèl·lules segreguen com a resposta a l'estimulació antigènica. La resposta antitumoral vehiculada per les **cèl·lules Th1**, mitjançant la secreció d'elevades quantitats de citocines proinflamatòries com IL-2, TNF- α i IFN- γ ,



promouen, no només l'activació de cèl·lules T i la citotoxicitat CTL, sinó també l'activitat antitumoral dels macròfags i de les cèl·lules NK així com un augment global de la presentació d'antígens tumorals. D'altra banda, les **cèl·lules B** constitueixen una porció significativa de TILs en molts càncers, inclòs el CM; la seva capacitat de produir anticossos, presentar antígens, secretar citocines i interactuar amb cèl·lules immunes permet diverses funcions que modulen el microambient tumoral i les respostes immunes cap a una resposta protumoral o antitumoral.⁹

1.6. Càncer de mama i cel·lularitat immunitària.

Tot i que el **CM** no es considera un tumor altament immunogen,³⁹ diversos estudis han destacat l'important paper que té la resposta immune en el pronòstic,⁴⁰⁻⁴³ la progressió, la resposta patològica completa a la teràpia neoadjuvant, la recaiguda i la supervivència.⁴⁴ Actualment s'accepta que una **resposta immune innata i adaptativa aberrant contribueix a la tumorogènesi** seleccionant clones agressives, induint immunosupressió i estimulant la proliferació i metàstasi de cèl·lules canceroses.⁴⁵ Durant les primeres etapes del desenvolupament del tumor, les cèl·lules immunològiques citotòxiques (NK, CD8) reconeixen i eliminen les cèl·lules tumorals més immunògenes. En aquesta primera fase d'eliminació es selecciona la proliferació de variants de cèl·lules tumorals menys immunògenes i per tant invisibles per a la detecció immune. A mesura que el teixit neoplàsic evoluciona cap a un tumor detectable clínicament, diferents subconjunts de cèl·lules immunes influeixen en l'evolució del tumor i s'ha descrit que els nivells elevats de TIL en el tumor es correlacionen amb un bon pronòstic en molts càncers sòlids i d'altra banda, nivells alts d'infiltració de macròfags es correlacionen amb un pitjor



pronòstic.³³

Diversos estudis han descrit els diferents tipus de cèl·lules immunes situades en el microambient del CM infiltrant^{44,46} i altres han detallat el seu paper en la neoadjuvència⁴⁷ i en el CM in situ.⁴⁸ Algunes d'aquestes cèl·lules immunes **augmenten la probabilitat de metàstasi tumoral a distància**, particularment estimulant l'increment del nombre de vasos limfàtics (**limfangiogènesi**), mitjançant la secreció de factors de creixement endotelial vascular C i D (VEGF-C i VEGF-D: en anglès Vascular Endothelial Growth Factor C i D).⁴⁹⁻⁵¹ No obstant això, abans de la propagació del tumor a llocs llunyans, els vasos limfàtics nous del tumor primari són utilitzats per les cèl·lules tumorals per arribar als GLA i promoure la difusió de les cèl·lules tumorals i la metàstasi a distància.^{52,53} Aquest procés està promogut per les poblacions cel·lulars immunes que, a més d'estimular l'angiogènesi i la limfangiogènesi, poden activar una resposta inflamatòria en el tumor que afavoreix la difusió del càncer als GL.⁵⁴

La **metàstasi als GL** juga un paper decisiu en la propagació de les cèl·lules metastàtiques a altres GL sense metàstasi i a òrgans distants,^{55,56} i la resposta immune diferent en aquests determina la immunitat antitumoral.⁵⁷ Alguns estudis han demostrat que, en CM, el VEGF-C expressat pel tumor activa fortament la limfangiogènesi als GLS, fins i tot abans que es produeixi la metàstasi en aquest, i així es prepara al gangli per a la futura recepció tumoral.^{32,58} Tot i això, ni el mecanisme ni el paper precís de la resposta immune del tumor primari afavorint la metàstasi al GL ni la relació entre la cel·lularitat immune dels GL i les metàstasis a distància s'entenen completament.



Respecte a l'estudi de la cel·lularitat immune en GLA⁻, només hem pogut trobar un estudi que hagi investigat, amb immunohistoquímica, la cel·lularitat immune de GLA⁻ i l'hagi comparat amb la població immune dels GLS.⁵⁹ Aquest estudi va revelar que el perfil immune del GLA no GLS tenia importància clínica per als pacients amb CM en estadis inicials, al comprovar que determinades poblacions immunes dels GLA (limfòcits CD4⁺ i cèl·lules dendrítiques CD1a) permetien una millor estratificació de la supervivència lliure de malaltia de les pacients amb CM T1 i T2. Posteriorment altres estudis, amb diferents metodologies, han avaluat els GLA per veure les alteracions de la cel·lularitat immune i s'ha demostrat que l'expressió gènica de cel·lularitat immune dels GLA⁻ estava regulada a la baixa en pacients diagnosticades de CM amb GLA⁺ (pdGLA⁺) en comparació a la resposta immune en pacients diagnosticades de CM amb GLA⁻ (pdGLA⁻).⁶⁰

Si bé cada cop es coneix més sobre el paper del sistema immunitari en el creixement i evasió de les metàstasis ganglionars^{32,56} i es comença a tenir consciència del paper essencial en la immunitat antitumoral dels GLS i dels GL que drenen tumors, aquests són relativament infravalorats i infrautilitzats clínicament.⁵⁶

1.6.1. Limfòcits en el càncer de mama

Els limfòcits són una part fonamental del sistema immune innat i adaptatiu, formen part de la resposta immune contra el càncer i s'han correlacionat positivament amb la supervivència en càncer.^{61,62} Per això, en l'actualitat, els TILs són d'interès particularment per a investigadors i per als patòlegs. Els TILs són considerats biomarcadors amb implicacions pronòstiques i terapèutiques en el CM en general i



amb major intensitat en algun dels seus subtipus moleculars en particular.^{61,62} Els darrers anys s'han elaborat unes recomanacions internacionals per a l'avaluació dels TILs, no només per als carcinomes infiltrants sinó també per als carcinomes in situ i els tumors residuals postneoadjuvència.^{4,62} Els TILs són classificats com estromals o intratumorals i són avaluats visualment a l'hematoxilina-eosina (HE) usant una escala continua. El grau i el tipus d'infiltrat limfocitari és un factor pronòstic en les situacions de neoadjuvència, adjuvència i metàstasi en casos de CM del tipus moleculars subrogats TN i HER2⁺ i un predictor d'una major probabilitat de resposta patològica completa a la quimioteràpia neoadjuvant.⁹

Com s'ha esmentat anteriorment, la presència de **metàstasi als GLA** és un factor de mal pronòstic, ja que significa que les cèl·lules tumorals han començat a estendre's a altres regions del cos. El paper dels limfòcits en aquesta propagació inicial als GL no ha estat molt estudiat. Tot i això, alguns estudis que han avaluat tant el tumor primari com els GL, han trobat que els limfòcits podrien estar implicats en aquesta primera etapa de difusió del CM.⁶³ Un estudi en particular va trobar una forta correlació positiva entre **els limfòcits T CD4 i CD8 del tumor primari** amb l'aparició de metàstasi als GL.⁶⁴ Altres estudis, però, han donat resultats contradictoris, ja que s'han trobat ambdós marcadors en proporcions més elevades en les pdGLA⁻ en comparació amb les pdGLA⁺.⁶⁵ D'altra banda, hi ha proves que els **limfòcits T reguladors (FOXP3⁺)** estan associats amb una resposta immune més dèbil contra el càncer i una major probabilitat de metàstasi als GLS. Un estudi amb immunohistoquímica (IHQ) realitzat amb CM humà, va mostrar que altes densitats de cèl·lules FOXP3⁺, citotòxiques CD8⁺, i limfòcits T CD3 funcionals (cadena ζ⁺), en



els tumors primaris i els seus GLS, estaven associades a tumors més agressius, negativitat dels receptors hormonals, més alts índexs de proliferació, major grau histològic i presència de LVI. Aquest mateix estudi, també va demostrar que la variabilitat en els marcadors immunitaris citats entre els diferents subtipus subrogats de CM era menor en els GLS metastàtics que la variabilitat entre els diferents subtipus dels tumors primaris.⁶⁶ Aquests resultats són rellevants perquè si bé es va trobar una freqüència més elevada de marcadors immunitaris en tumors més agressius, es coneix que els limfòcits T reguladors FOXP3⁺ inhibeixen la resposta immune contra el càncer suprimint les cèl·lules T efectores o secretant citocines que inhibeixen la presentació d'antígens.⁶⁷ Respecte als limfòcits B, el seu paper és controvertit ja que en models murins, l'absència de cèl·lules B s'ha relacionat amb una tumorigènesi deficient i per contra, la presència de TIL CD20⁺ en CM en humans s'ha associat amb una supervivència augmentada i una baixa proporció de recurrències.⁹

En relació amb la **metàstasi als GLS**, es va demostrar que els limfòcits T reguladors FOXP3⁺ als GLS discriminaven clarament entre les pacients amb CM amb metàstasi i sense, i que **un contingut alt de limfòcits T reguladors FOXP3⁺ als GLS està associat amb la presència de micrometàstasi** patològicament indetectables.⁶⁸ Els autors d'aquest estudi van suggerir que la presència de limfòcits T reguladors FOXP3⁺ als GLS es podria utilitzar com a biomarcador IHQ efectiu de pronòstic en CM.⁶⁸ Al mateix temps un altre estudi va demostrar en pacients amb CM, que els nivells de limfòcits T reguladors FOXP3⁺ en els GLS metastàtics eren més elevats que en els GLS sense metàstasi, i que aquestes **cèl·lules tumorals podrien ser**



CEL·LULARITAT IMMUNE ALS GANGLIS AXIL·LARS NEGATIUS

DE PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA



atretes o induïdes per la indoleamina-2, 3-dioxigenasa (IDO), fins i tot abans que es detectés aquesta metàstasi als GLS.⁶⁹ Igualment, una metanàlisi d'estudis d'IHQ va trobar una **correlació positiva entre el nivell de limfòcits T reguladors FOXP3⁺ en el tumor primari i la presència de GLA⁺**.¹² Tanmateix, un altre estudi ha mostrat resultats contradictoris, ja que va trobar que la concentració de limfòcits T reguladors FOXP3⁺ era similar quan comparaven GLS metastàtics i sense metàstasi, cosa que podria suggerir que aquestes cèl·lules no estarien afectant el creixement tumoral en els GLS.⁷⁰ Tot i això, els autors van suggerir que podria haver-hi un augment de la resposta dels limfòcits Th2 als GLS metastàtics.⁷⁰ La variació dels resultats publicats pot originar-se per diferències entre el conjunt de pacients estudiats, el nombre de casos o el mostreig i també, a les diferències entre subtipus moleculars de CM, els quals poden afectar la cel·lularitat immune. Aquests estudis demostren que encara estem lluny d'arribar a una conclusió clara sobre el paper específic de les cèl·lules T reguladores en els GLA⁺ del CM i sobre quin és el seu valor com a marcador predictiu en estudis d'IHQ.

Tenint en compte amb més detall l'important paper de les **cèl·lules T reguladores només en el CM ductal infiltrant**, es va observar una associació entre el nombre de limfòcits T reguladors en els GLS i la mida del tumor primari. Tanmateix, aquesta correlació no es va veure quan hi havia metàstasi en els GLS, cosa que suggereix que la presència de limfòcits T reguladors en els GLS podria ser causada per factors produïts pel tumor primari que viatgen cap als GL.⁷¹ Tots aquests estudis suporten la idea de que hi ha una comunicació directa de factors de senyalització entre el tumor primari i el GLS, fins i tot abans que comenci la invasió tumoral. Altres autors



CEL·LULARITAT IMMUNE ALS GANGLIS AXIL·LARS NEGATIUS

DE PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA



ja han proposat que els canvis en els GL poden precedir la metastasi i que el tumor primari influeix en el nínxol metastàtic dels GLS o dels GL, però són necessàries més investigacions que abordin aquests aspectes.^{32,59} Més recentment s'ha publicat un estudi comparatiu, fet amb citometria de flux, en el que es comparen les principals poblacions immunes dels GLS de pacients amb CM, amb i sense metastasi, amb ganglis sans procedents de mastectomies profilàctiques.³⁶ En aquest estudi es conclou que la immunosupressió induïda pel CM en els GL afectes s'evidencia com un augment en les proporcions de limfòcits T reguladors i cèl·lules supressores d'origen mieloide així com per un estat generalitzat d'anergia de les cèl·lules T que coincideix amb una activació bloquejada de les DC residents en aquests GL més que la població de DC migrant.³⁶

Quant a la **inhibició de la resposta immune dels limfòcits**, alguns estudis s'han centrat en el **PD-L1**, que expressat pel tumor pot interaccionar amb els receptors 1 de mort programada (PD-1: en anglès Programmed Death-1) dels limfòcits T, inhibint la resposta immune.⁷² L'expressió de PD-L1 en CM s'ha vist relacionada amb una millor supervivència global (OS: en anglès Overall Survival), però no amb la supervivència lliure de malaltia (DFS: en anglès Disease Free Survival), mentre que PD-L2 tampoc ha estat associat amb cap de les dues.⁷³ A més, PD-L1 s'expressava en el tumor primari de pacients preferentment amb GLA⁺.⁷³ Particularment, en pacients amb CM HER2⁺ s'ha vist que els nivells més alts de PD-L1 estaven vinculats amb una OS més llarga. Tanmateix, a diferència d'altres estudis, es va publicar una correlació entre PD-L1 i l'absència de metastasi en els GLA,⁷⁴ el que podria ser explicat pels subtipus molecular de les pacients de l'estudi.



CEL·LULARITAT IMMUNE ALS GANGLIS AXIL·LARS NEGATIUS

DE PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA



Un estudi va trobar que gairebé tots els GLS metastàtics i no metastàtics dels pacients amb CM expressaven limfòcits PD-1⁺, tot i que els GLS amb metastasi presentaven més limfòcits PD-1⁺ que els GLA sense metastasi.⁷⁵ Al mateix temps, un altre estudi va publicar resultats similars, però de pacients amb CM TN. Com que el tumor primari era negatiu per al PD-L1 en una proporció elevada de casos, els autors van proposar que podria ser més adequat avaluar els GL, en què PD-L1 està més fortament representat i expressat positivament.⁷⁶ També cal destacar una relació entre la presència de PD-L1 al GL i un pronòstic més pobre, independentment de l'expressió de PD-L1 al tumor primari, que també és coherent amb la freqüència més alta de TIL que van trobar al gangli i amb els resultats obtinguts per altres autors.^{77,78} Tot i que estudis previs relacionen l'expressió de PD-1 en el GLS o GL de pacients amb CM amb metastasi, en els estudis de melanoma també s'ha trobat que un percentatge elevat de limfòcits PD-1⁺ està associat a un mal pronòstic.⁷⁹ En conjunt, aquestes evidències suggereixen que PD-L1 és una molècula prometedora per estudiar el pronòstic del CM, ja que hi ha molts resultats que mostren la seva associació amb l'OS o amb la metastasi als GLA. Tot i això, la investigació del PD-L1 és encara relativament recent i es necessiten més evidències per entendre el seu paper en la progressió del CM i en la metastasi a GLA.

1.6.2. Macròfags en el càncer de mama

Tot i que els limfòcits representen la població cel·lular predominant en infiltrats tumorals, altres tipus de cèl·lules participen en la regulació de la resposta immune del càncer. Els macròfags són una de les principals poblacions de cèl·lules immunes



presentes en CM.⁸⁰ Quan es troben en un tumor, s'anomenen macròfags associats al tumor (TAM: en anglès Tumor Associated Macrophages) i s'acumulen allí, estimulats per molècules quimiotàctiques secretades per les cèl·lules tumorals.⁸¹ Els macròfags normalment es poden dividir en fenotips M1 i M2. Els macròfags M1 són capaços d'activar la resposta dels limfòcits Th1; també presenten activitat citotòxica contra cèl·lules neoplàstiques i són cèl·lules amb elevada capacitat per presentar antígens. Per contra, els macròfags M2 tenen una capacitat de presentació d'antígens inferior, poden promoure l'angiogènesi i són capaços d'inhibir la resposta immune dels macròfags M1.⁸⁰ Per aquests motius, es creu que els macròfags M2 són perjudicials per als pacients amb càncer.⁸² Així i tot, aquesta categorització extrema dels TAM no representa totalment els diferents subtipus de macròfags i un model d'espectre descriuria amb més precisió la matriu de fenotips, molts dels quals encara cal caracteritzar.⁸³

Diversos estudis han demostrat el paper dels **TAM en** el pronòstic i el tractament del **CM**.^{63,84-86} En particular, s'ha demostrat que els monòcits es desenvolupen en diferents macròfags madurs depenent de l'entorn tumoral al qual estan exposats.^{87,88} A més, en CM, la infiltració dels TAM al tumor primari, que es mesura generalment amb el marcador CD68, està associada a la invasió dels GL⁸⁹ i se sap que estimula la metastasi limfàtica i, per tant, està correlacionada negativament amb el pronòstic del CM.⁹⁰ Les cèl·lules CD68⁺ del tumor s'associen amb la proteïna ubiquitin-ligasa MIB1, un enzim implicat en la regulació de l'apoptosi i associat a la mida i la proliferació del tumor, conferint a les cèl·lules CD68⁺ un fenotip del tumor més agressiu.⁹¹ En alguns estudis, la presència de TAM positius a CD163 (fenotip



M2) ha estat fortament relacionada amb trets agressius com ara la LVI, el càncer d'interval, subgrups moleculars no luminals i supervivència reduïda.⁹²

Pel que fa a la infiltració dels **GL**, la densitat de macròfags CD169⁺, també coneguts com a macròfags M1, i la relació de macròfags CD169⁺/CD68⁺ en els GL regionals de pacients amb CM s'ha correlacionat positivament amb un millor pronòstic de la malaltia, inclosa l'absència de metàstasis en els GL.⁸¹ De fet, es creu que els macròfags CD169⁺ són decisius per a l'activació dels limfòcits CD8⁺ en els GL del CM, ja que estan involucrats en el procés de presentació d'antigen.⁹³ Un altre estudi va informar que les baixes concentracions de macròfags CD163⁺ als GL estan associades amb un major risc d'invasió metastàsica als ganglis, i que, en GLS ja metastàtics, nivells alts de cèl·lules CD163⁺ estan vinculats a un baix nivell d'infiltració de cèl·lules CD8⁺,⁹⁴ que es considera un factor negatiu en CM.⁹⁵ En efecte, el tumor primari podria estimular els macròfags a secretarIDO, un enzim capaç d'induir tolerància immune al produir inhibició de la funció de les cèl·lules T. En aquestes condicions, tot i que la funció normal dels macròfags és oferir protecció contra la metàstasi en el GLS, la seva funció podria reprogramar-se per factors secretats pel tumor primari, amb la consegüent transformació a macròfagsIDO⁺ i per facilitant la tolerància immunològica a la metàstasi ganglionar.⁹⁴ D'acord amb això, un estudi recent de CM luminal B, va trobar que la presència de macròfags CD163⁺ en el tumor primari i en els GLS, juntament amb la sobrerregulació de la via CXCR4/CXCL12, estimulen la migració cel·lular i la metàstasi.⁹⁶



En l'actualitat, s'està estudiant àmpliament el paper dels macròfags en la progressió del CM i diversos estudis relacionen la seva funció amb la propagació metastàtica als GLA.^{81,90,94,96} El paper proinflamatori dels macròfags podria augmentar la presència de GLA metastàtics, tal com s'observa en alguns estudis fets amb CD68.^{90,91} Tot i això, també hi ha fenotips específics de macròfags que ofereixen protecció contra la propagació metastàtica als GL,^{81,94,97} que recolza encara més la idea d'una àmplia gamma de subtipus de macròfags i els seus diferents rols en la progressió del CM.

1.6.3. Cèl·lules dendrítiques en el càncer de mama

Les DC són essencials per a la resposta immune, estan involucrades en la presentació d'antígens i en la secreció de senyals coestimulants i citocines.⁹⁸ En càncer, les DC presenten activitats pro i antitumoral, depenent del microambient al qual estan exposades. Per això, s'estan estudiant de prop les seves funcions en càncer com a indicador del desenvolupament i pronòstic del tumor³⁷ i com a mecanisme per activar la resposta dels limfòcits T contra el tumor.^{23,63}

La infiltració per DC **plasmocitoides** (pDC: en anglès Plasmacytoid dendritic cells) del tumor primari està estretament relacionada amb una evolució negativa de les pacients amb CM.^{99,100} En els teixits del **tumor primari** de pdGLA⁺ es troben percentatges més elevats de pDC que en els tumors primaris de les pdGLA⁻. Es creu que les pDC estimulen les vies implicades en la migració cel·lular des del tumor primari cap als GLA.¹⁰¹



CEL·LULARITAT IMMUNE ALS GANGLIS AXIL·LARS NEGATIUS

DE PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA



El nombre total de DC, independentment de l'estat de maduració, és similar en els GLS metastàtics i no metastàtics.^{99,102} No obstant, els GLS amb metàstasi presenten menys DC madures que els GLS sense metàstasi, cosa que suggereix que hi ha presentació ineficient d'antígens en el grup de pacients amb GLS metastàtics, provocant una resposta immune més dèbil contra les cèl·lules tumorals.^{99,100} Aquest fet es va confirmar en un altre estudi que va demostrar que una freqüència major de DC immadures en CM permet diferenciar les pacients amb més risc de desenvolupar recurrències locals, regionals o llunyanes en un termini de 60 mesos,¹⁰³ mentre que la presència de **DC que presenten la glicoproteïna de membrana 3 associada al lisosoma** (LAMP3: en anglès Lysosome-associated membrane glycoprotein 3), un marcador de DC **madures** en els GLS de les pacients amb CM, està associat a un risc menor o nul de metàstasi al GL.¹⁰⁴ D'acord amb això, un estudi que va analitzar el **CD1a**, marcador de DC de Langerhans i cèl·lules interdigitants, va detectar més DC en l'èstroma del tumor primari i als ganglis de pacients amb GL negatius que en pacients amb GL positius.⁶⁵

A més de la quantitat i el nivell de maduració de les DC, factors com l'**agrupament** també estan relacionats amb la resposta immune al càncer. En un estudi on es van comparar GL intramamaris de subjectes sans (mastectomia profilàctica o reduccions de mama) amb GLA metastàtics i no metastàtics (no GLS) de pacients amb CM, els resultats van demostrar que les **DC CD83⁺ madures** tendeixen a agregar-se en grans cúmuls en els GL sans, mentre que en les pacients amb CM es van detectar menys cúmuls (i més petits) o cap cúmul de DC madures en els GLA. A



més, es va associar una major acumulació en GL metastàtics de pacients amb CM amb un temps lliure de malaltia més llarg.¹⁰⁵

1.6.4. Altres cèl·lules immunes en el càncer de mama

Les **cèl·lules supressores derivades de cèl·lules mieloides** tenen activitat supressora sobre les cèl·lules T (CD4⁺, CD8⁺ i NK). En el CM semblen promoure la metastasi estimulant l'activitat migratòria i d'invasió de les cèl·lules tumorals.¹⁰⁶ Les cèl·lules supressores derivades de cèl·lules mieloides circulants estan augmentades en totes les pacients amb CM¹⁰⁷ i els seus nivells es relacionen amb l'estadiatge clínic i la càrrega metastàtica.¹⁰⁸

Els neutròfils han estat també identificats recentment com a actors importants en el microambient tumoral. Els **neutròfils associats al tumor** (TAN: en anglès Tumor Associated Neutrophils) poden comportar-se com a cèl·lules antitumorals, millorant l'activitat dels limfòcits CD8 i exercint una activitat citotòxica directa contra les cèl·lules canceroses o neutròfils N1, o per contra, poden promoure el creixement del càncer mitjançant una diferenciació N2.¹⁰⁹ Aquestes dues polaritzacions oposades semblen estar influenciades per l'efecte del TGF- β alliberat en el microambient tumoral per les cèl·lules canceroses, que inhibeix el reclutament de neutròfils de la sang reduint les molècules d'adhesió cel·lular a l'endoteli i induint la diferenciació de TAN cap al fenotip N2.¹⁰⁹ En CM els TAN s'han associat a un pronòstic deficient i, a més a més, semblen donar suport al procés metastàtic que indueix la transició epitelial mesenquimal mitjançant l'alliberament de l'inhibidor de la metal·loproteïna TIMP-1,¹¹⁰ i també generen un entorn favorable en els llocs metastàtics.¹¹¹ En pacients afectats per tumors



malignes, les concentracions de cèl·lules inflamatòries poden variar fins i tot en sang perifèrica. Una proporció de neutròfils/limfòcits elevada en sang perifèrica de pacients amb CM està relacionada amb un pronòstic deficient en termes d'OS i DFS, i aquest efecte és més acusat en els CM RE negatius i HER2 negatius.¹¹² Aquesta proporció neutròfils/limfòcits alta també és un predictor d'una pitjor resposta als tractaments neoadjuvants, ja que s'associa a una taxa més baixa de resposta patològica completa i de supervivència lliure de recaiguda.¹¹³

1.6.5. Resum del paper de les cèl·lules immunes en el càncer de mama

Totes aquestes dades recents sobre el microambient immune del tumor primari, dels GL i de les metàstasis a distància així com el paper que juga la cel·lularitat immune dels GLS i els GL en el desenvolupament de metàstasis a distància es poden resumir en els següents punts i en la **figura 2** (vegeu més avall):

- 1- **En el tumor primari del CM**, una major **acumulació de TIL**, majoritàriament CD4⁺ i CD8⁺, i de pDC està vinculada a GLA⁺.
- 2- Al mateix temps, les **pDC**, els limfòcits **T reguladors FOXP3⁺** i els macròfags **CD68⁺** presents en el tumor primari semblen estar involucrats en la migració de les cèl·lules tumorals del tumor primari als GLA.
- 3- **El tumor pot expressar PD-L1**, que interactua amb PD-1 dels limfòcits T, inhibint la resposta immune antitumoral.
- 4- En els GLA⁺, les **pDC** es troben en concentracions més altes i es correlacionen amb un **major nombre de limfòcits T reguladors FOXP3⁺** i una **menor activació dels limfòcits T CD8⁺**. La menor activació dels limfòcits T CD8⁺ també es veu afectada

per la secreció d'IDO pels **macròfags M2 CD163⁺**, que són estimulats pel tumor primari.

5- Els **GLA⁺** també tenen una **major concentració de DC immadures**, la qual cosa suggereix una presentació antigènica ineficient i, per tant, una resposta immune deficient. Les DCs **CD1a⁺** i les que expressen els marcadors madurs **CD208⁺ (DC-LAMP3)**, així com els macròfags **M1 CD169⁺** es troben en major número en el tumor primari i els GLA de pacients amb GLA⁻, que en pacients amb GLA⁺, la qual cosa suggereix una resposta immune més eficient contra el tumor.

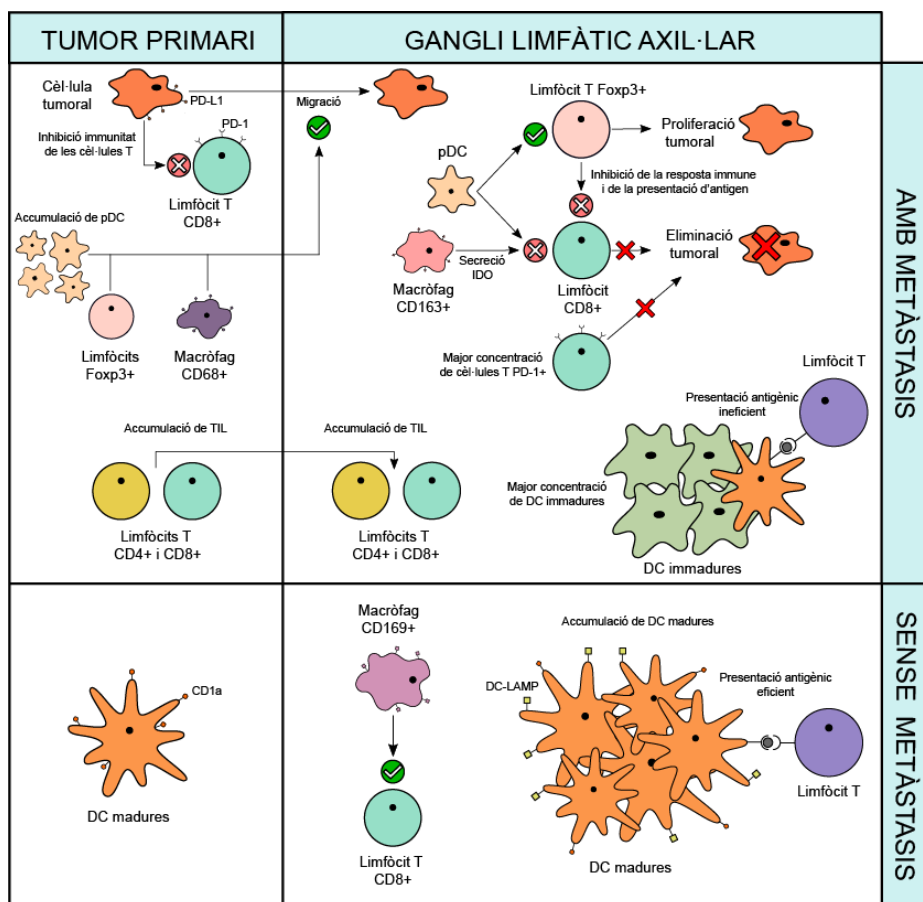


Figura 2. Resum de la implicació del microambient immunològic en la metastasi als ganglis limfàtics axil·lars (Gibert-Ramos et al, 2019).⁶³

1.7. Fonaments científicotècnics de l'estudi

La bibliografia mostra que el tumor modifica no només la cel·lularitat immunitària en el tumor primari sinó també en els GLA⁺. D'altra banda, hi ha poca evidència i confosa dels canvis que existeixen en la cel·lularitat immune dels GLA⁻ i poc es



coneix sobre si aquestes modificacions en els GLA^- podrien associar-se a una evolució clínica diferent del pacient.

Avui dia disposem de tecnologies que podem usar per estudis d'investigació a gran escala i que ens permeten estudiar teixits tumorals d'una manera ràpida i homogènia. La primera d'aquestes tecnologies és **la IHQ**, que és una tècnica de laboratori usada diàriament en el diagnòstic anatomopatològic^{114,115} i que ha estat amplament emprada en la recerca biomèdica durant els últims 30 anys.¹¹⁶ La segona són les **matrius multiteixit** (TMA: en anglès Tissue Microarrays) que s'han convertit en una metodologia plenament establerta i acceptada per la comunitat científica en la recerca del càncer,^{117,118} permeten un ús eficient dels recursos i l'estudi d'un gran nombre de mostres de tumors en condicions homogènies. Finalment per la detecció i quantificació de les immunotincions es poden usar tècniques d'**anàlisi i quantificació automatitzada d'imatges digitals sobre portaobjectes virtuals** (WSI: en anglès Whole Slide Imaging).¹¹⁹ Totes aquestes tecnologies ens han permès analitzar, de manera ràpida i eficient, els marcadors estudiats en aquest estudi.

En el present estudi hem investigat, amb tècniques d'IHQ, TMA i anàlisis d'imatges digitals, si els patrons de cel·lularitat immune tissular presents als tumors primaris i als GLA^- difereixen entre un grup de $pdGLA^+$ (pacients amb metàstasis axil·lars) i un grup de $pdGLA^-$ (pacients sense metàstasi axil·lars), i com aquestes possibles diferències en la seva composició de cèl·lules immunes podrien relacionar-se amb una evolució clínica diferent de les pacients amb CM.



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI



FUNDACIÓ DOCTOR FERRAN

CEL·LULARITAT IMMUNE ALS GANGLIS AXIL·LARS NEGATIUS

DE PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA



IISPV
INSTITUT
D'INVESTIGACIÓ
SANITÀRIA
PERE VIRGILI



Hospital de Tortosa
Verge de la Cinta

HIPÒTESI



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI



FUNDACIÓ DOCTOR FERRAN

CEL·LULARITAT IMMUNE ALS GANGLIS AXIL·LARS NEGATIUS

DE PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA



ISP
INSTITUT
D'INVESTIGACIÓ
SANITÀRIA
PERE VIRGILI

HTVC

Hospital de Tortosa
Verge de la Cinta

2. HIPÒTESI

El patró de cel·lularitat immune del tumor primari i dels GLA⁻ pot estar associat a la presència de metàstasis en els GLA (GLA⁺) al moment del diagnòstic en pacients amb CM.

Les diferències en els patrons de cel·lularitat immune en els GLA⁻, entre els grups de pdGLA⁺ i pdGLA⁻, poden tenir un efecte sobre l'evolució clínica d'aquestes pacients amb CM.



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI



FUNDACIÓ DOCTOR FERRAN

CEL·LULARITAT IMMUNE ALS GANGLIS AXIL·LARS NEGATIUS

DE PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA



ISP
INSTITUT
D'INVESTIGACIÓ
SANITÀRIA
PERE VIRGILI

HTVC

Hospital de Tortosa
Verge de la Cinta



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI



FUNDACIÓ DOCTOR FERRAN

CEL·LULARITAT IMMUNE ALS GANGLIS AXIL·LARS NEGATIUS

DE PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA



INSTITUT
D'INVESTIGACIÓ
SANITÀRIA
PERE VIRGILI



Hospital de Tortosa
Verge de la Cinta

OBJECTIUS



CEL·LULARITAT IMMUNE ALS GANGLIS AXIL·LARS NEGATIU
DE PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA



3. OBJECTIUS

Objectius principals:

1. Avaluar sí els patrons de cel·lularitat immune del tumor primari i dels GLA⁻ en pacients amb CM estan associats a la presència de GLA⁺ al diagnòstic.
2. Determinar si la composició cel·lular d'aquests patrons pot contribuir a una diferent evolució clínica de les pacients.

Objectius secundaris:

1. Avaluar els patrons de cel·lularitat immune en dues localitzacions diferents, en el tumor primari (intratumoral) i en els GLA⁻, en dos grups de pacients amb CM: pdGLA⁺ i pdGLA⁻.
2. Avaluar estadísticament les diferències en les variables clíniques, patològiques i en la concentració de cèl·lules immunes en les diferents localitzacions estudiades entre els dos grups de pacients: pdGLA⁺ i pdGLA⁻.
3. Generar models de regressió logística multivariant amb capacitat predictiva de la presència de metàstasi axil·lar al diagnòstic utilitzant les variables clíniques, patològiques i de cel·lularitat immune de les pacients.
4. Avaluar les diferències en la supervivència entre les pdGLA⁺ i pdGLA⁻ i les pacients predites pels models multivariants de regressió logística.



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI



FUNDACIÓ DOCTOR FERRAN

CEL·LULARITAT IMMUNE ALS GANGLIS AXIL·LARS NEGATIUS

DE PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA



ISP
INSTITUT
D'INVESTIGACIÓ
SANITÀRIA
PERE VIRGILI

HTVC

Hospital de Tortosa
Verge de la Cinta



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI



FUNDACIÓ DOCTOR FERRAN

CEL·LULARITAT IMMUNE ALS GANGLIS AXIL·LARS NEGATIUS

DE PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA



INSTITUT
D'INVESTIGACIÓ
SANITÀRIA
PERE VIRGILI



Hospital de Tortosa
Verge de la Cinta

MÈTODES



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI



FUNDACIÓ DOCTOR FERRAN

CEL·LULARITAT IMMUNE ALS GANGLIS AXIL·LARS NEGATIUS

DE PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA



ISP
INSTITUT
D'INVESTIGACIÓ
SANITÀRIA
PERE VIRGILI

HTVC

Hospital de Tortosa
Verge de la Cinta



4. MÈTODES

4.1. Disseny de l'estudi i selecció de participants

Els resultats del treball es van obtenir mitjançant un disseny retrospectiu de cohorts. Es van seleccionar 141 pacients diagnosticades entre 2000 i 2008 de CM invasiu de tipus no especial (75 pdGLA⁺ i 66 pacients pdGLA⁻). Per poder realitzar l'estudi, totes les pacients incloses en el mateix havien de tenir biòpsies amb suficient teixit representatiu tant en els blocs de parafina del tumor primari com en els blocs dels GLA⁻. Es va revisar i comprovar la disponibilitat del teixit de tots els casos estudiant una nova HE. Es van excloure de l'estudi els GLA⁻ que havien estat remesos com GLS, ja que en algun estudi s'ha observat que existeixen diferències en la cel·lularitat immune entre els GLS i els GLA que no són GLS.⁶³ Les biòpsies van ser seleccionades del Banc de Tumors del Departament d'Anatomia Patològica de l'Hospital de Tortosa Verge de la Cinta. L'estudi va ser aprovat pel Comitè d'Ètica de l'Hospital Joan XXIII de Tarragona (referència 22p/2011) i per la Comissió de recerca de la Gerència Territorial de les Terres de l'Ebre. Totes les pacients van proporcionar el seu consentiment informat per escrit, d'acord amb la legislació espanyola, per participar en l'estudi i per a l'ús de les seves biòpsies i de les seves dades clíniques. Per realitzar l'estudi es va seguir la guia "Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) Statement: guidelines for reporting observational studies".¹²⁰



CEL·LULARITAT IMMUNE ALS GANGLIS AXIL·LARS NEGATIUS

DE PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA



Es van fer un càlcul de la grandària mostral, on vam obtenir el nombre de 100 pacients com a mostra suficient per a l'estudi i es va calcular el risc relatiu a través de la plataforma web GRANMO de l'Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques (IMIM; [Http://www.imim.es/ofertadeserveis/software-public/granmo/](http://www.imim.es/ofertadeserveis/software-public/granmo/)). El càlcul es va realitzar per trobar un patró de cel·lularitat immune capaç de predir la metàstasi axil·lar amb un risc d'1,6 vegades superior respecte a un altre patró que pogués tenir el grup de pacients amb GLA⁻. Els valors utilitzats en el càlcul es descriuen a continuació. Acceptant un risc α de 0,05 i un risc β de 0,2, en una prova de dos costats, foren necessaris 50 participants exposats a cert tipus de patró de cel·lularitat immune esperat i 50 participants no exposats per a un risc relatiu de mort superior o igual a 1,6 en el grup exposat per ser estadísticament significatiu. La proporció de morts entre persones del grup no es va estimar en 0,5, segons el principi de màxima indeterminació, ja que no hi ha dades anteriors sobre el tipus de patró de cel·lularitat immune que pot predir la mort. Es va preveure una taxa d'abandonament del 10%.¹²¹

Una comprovació es va realitzar a posteriori per estar segurs de que es tenia una grandària suficient per als models de regressió logística que avaluaven les variables associades a la metàstasi axil·lar. Per avaluar models de regressió logística, s'ha suggerit que les dades han de contenir almenys deu esdeveniments per a cada variable registrada en un model de regressió,¹²² o fins i tot menys en alguns casos.¹²³ En el present estudi hi ha 66 esdeveniments i 4 variables incloses en els models multivariants finals, amb la qual cosa s'assegura una mida de mostra prou gran per a l'anàlisi multivariant.

4.2. Dades clinicopatològiques i avaluació de la cel·lularitat immune

Les dades clíniques i patològiques i de supervivència de les pdGLA⁺ i les pdGLA⁻ es van obtenir de la història clínica informatitzada de l'HTVC (SAP/PAT-Win).

Es va avaluar la cel·lularitat immune en el tumor primari i en els GLA⁻. La cel·lularitat immune es va avaluar en dos cilindres de teixits representatius de cada àrea estudiada (2 mm de diàmetre), procedents dels blocs de parafina de les biòpsies quirúrgiques de cada pacient. Amb aquesta finalitat, dos patòlegs vam seleccionar quatre àrees representatives a partir de les noves HE: dues àrees representatives de les biòpsies del CM del tumor primari i dues àrees del centre de les biòpsies dels GLA⁻.

Es van obtenir 564 cilindres [(141 pacients x 2 cilindres/regió x 2 regions (intratumoral i GLA⁻)] i es van incorporar a les TMA, com es va descriure anteriorment.¹²⁴ Cada TMA contenia 50 cilindres tissulars, amb la qual cosa es van obtenir 12 TMA. Es van realitzar 11 talls de cada TMA per a obtenir un número suficient de portaobjectes per tenyir tots els marcadors immunològics estudiats (figura 3).

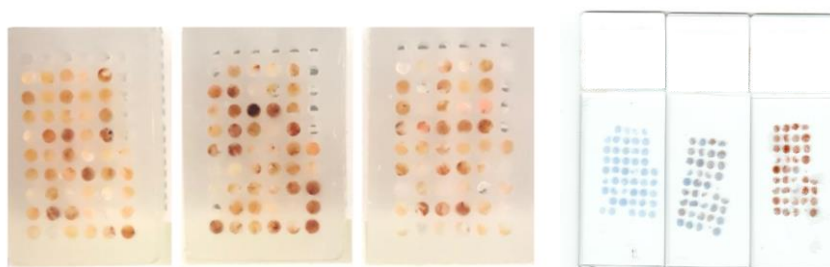


Figura 3. Exemples de TMA i portaobjectes tenyits amb IHQ

La tecnologia de les TMA és una tècnica inestimable per a un alt rendiment d'un gran nombre de casos¹²⁵ però el grau de correlació entre les TMA i les seccions de teixits sencers no sempre és ideal a nivell diagnòstic. No obstant, es considera àmpliament adequat en l'àmbit de la investigació d'un gran nombre de mostres en assaigs clínics o en estudis de recerca. De fet, una cerca de PubMed amb els termes *"Tissue microarray, breast cancer, immune"* va produir més de 100 articles, destacant l'àmplia utilització de TMA en les avaluacions de biomarcadors immunes del microambient tumoral i molècules dels punts de control immunes.^{126,127} A més, Salgado et al va explicar a la seva guia per avaluar els TILs que els resultats en TMA han demostrat concordança amb els d'altres estudis,¹²⁸⁻¹³¹ cosa que els converteix en una bona opció per a avaluacions ràpides.¹³² L'ús combinat de procediments d'anàlisi d'imatges i TMA permeten una anàlisi completament automatitzada de biomarcadors amb un flux de treball ràpid i optimitzat amb dades fiables i reproduïbles.

La detecció IHQ de les cèl·lules immunitàries es va realitzar usant l'anticòs primari específic (**taula 1**):

Taula 1. Cel·lularitat immune i anticossos immunohistoquímics emprats per a la seva identificació

Especificitat	Anticòs	Tipus	Clona (dilució)	Font (referència)
Limfòcits T helper	anti-CD4	Monoclonal	4B12 (LU)	Dako, Santa Clara, CA, EUA (IR649)
Limfòcits T citotòxics	anti-CD8	Monoclonal	C8/144B (LU)	Dako, Santa Clara, CA, USA (IR623)
Limfòcits T reguladors	anti-FOXP3	Monoclonal	236A/E7	CNIO, Monoclonal Antibodies Unit, Madrid, Spain
Cèl·lules NK	anti-CD57	Monoclonal	NK1 (1:20)	Zymed, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA (Zymed-18-0167Z)
Macròfags	anti-CD68	Monoclonal	KP1 (LU)	Dako, Santa Clara, CA, USA (IR609)
DC fol·liculars	anti-CD21	Monoclonal	1F8 (LU)	Dako, Santa Clara, CA, USA (IR608)
DC Langerhans	anti-CD1a	Monoclonal	010 (LU)	Dako, Santa Clara, CA, USA (IR069)
DC plasmocitoides	anti-CD123	Monoclonal	6H6 (1:25)	eBioscience, San Diego, CA, EUA (14-1239)
DC interdigitants	anti-S100	Policlonal	(1:40)	Leica Microsystems GmbH - Novocastra, Wetzlar, Alemanya (NCL-S100)
DC LAMP3*	anti-CD208	Policlonal	(1:50)	Proteintech, Rosemont, IL, EUA (12632-1-AP)
DC madures	anti-CD83	Monoclonal	1H4b (1:20)	Leica Microsystems GmbH - Novocastra, Wetzlar, Alemanya (NCL-CD83)

NK: Cèl·lules Natural Killer; DC: cèl·lules dendrítiques; LAMP3: Lysosome-associated membrane glycoprotein 3.

Nota: LU: llest per utilitzar

La detecció final es va fer utilitzant el mètode ENDAVISION™ FLEX (Dako, Santa Clara, CA, EUA), utilitzant el cromogen 3, 3' diaminobenzidina (DAB) com a substrat i contraincinció amb Hematoxilina. El protocol de tinció es va realitzar d'acord amb

les instruccions del proveïdor i el protocol del laboratori. En la **figura 4** es pot apreciar els patrons de tincions IHQ dels marcadors estudiats.

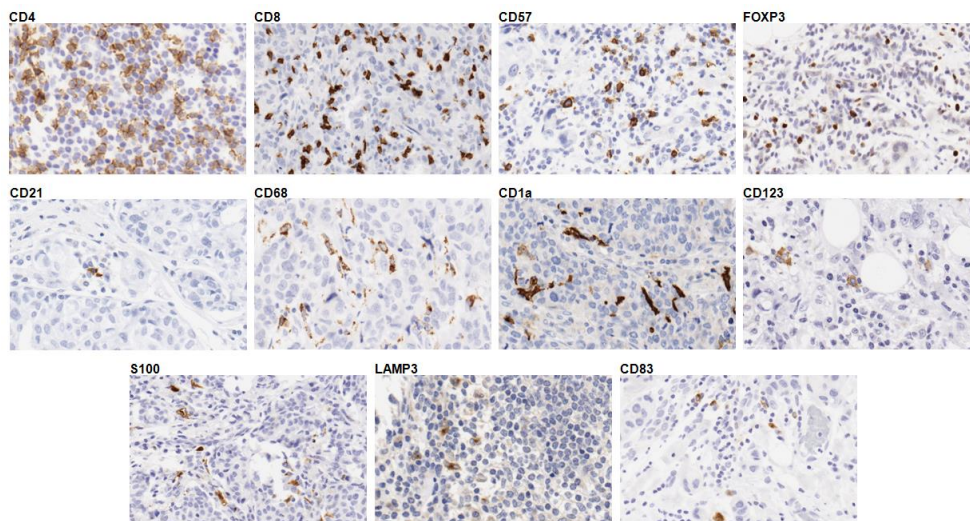


Figura 4. Patrons de tinció immunohistoquímica per als marcadors immunes estudiats en seccions de teixits fixats amb formaldehid i inclosos en parafina. Exemples de biomarcadors representatius amb tinció de membrana (CD4, CD8 i CD21), citoplasmàtica (CD68, CD123, i LAMP3), membrana i/o citoplasmàtica (CD57, CD1a i CD83), nuclear i/o citoplasmàtiques (S100) i nuclear [FOXP3]. Augment original, x40. (Lopez C i Bosch et al, 2020).¹³³

4.3. Digitalització de les matrius multiteixit

Es van escanejar els 132 portaobjectes (12 TMA x 11 marcadors immunològics) utilitzant l'escàner Aperio ScanScope XT amb un augment de 40x, i en format TIFF a una resolució de 0,25 µm/píxel. Les imatges digitals obtingudes de les TMA tenien una mida mitjana aproximada de 25 GB. La generació d'aquestes imatges digitals dels portaobjectes virtuals (WSI) és la modalitat d'imatge digital més recent emprada pels departaments de patologia a tot el món.¹³⁴ A causa de les dificultats

d'analitzar automàticament aquestes grans imatges digitals, es va extreure cada cilindre de la imatge original de cada TMA com una sola imatge utilitzant unes eines automàtiques desenvolupades prèviament pels membres del nostre equip (**figura 5**).^{135,136} Les 6.024 imatges extretes de les TMA (564 cilindres x 11 marcadors immunes) es van emmagatzemar en format TIFF i es van classificar segons el nom del marcador immune usat per la tinció IHQ i el seu número de cas. Les imatges de cada cilindre tenien una mida mitjana al voltant de 500 MB.

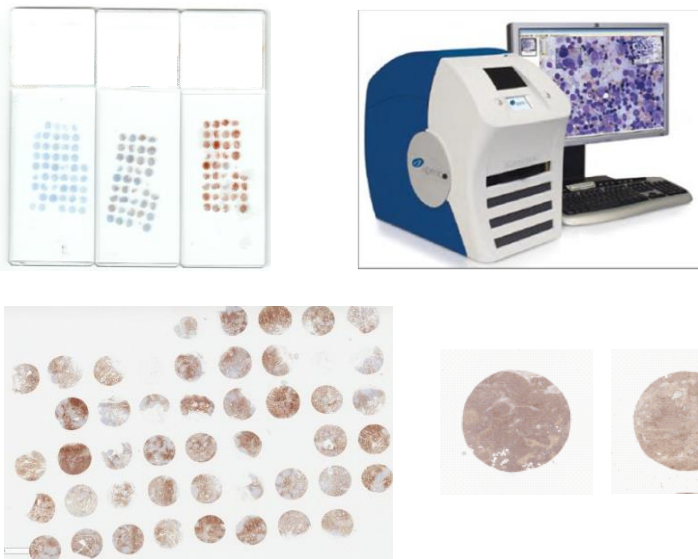


Figura 5. Representacions de portaobjectes escanejats amb l'Aperio ScanScope XT i d'imatges individuals extretes d'aquests portaobjectes

4.4. Anàlisi digital de les mostres

Les àrees dels cilindres tissulars tenyides amb IHQ per als diferents marcadors immunològics es van avaluar mitjançant procediments analítics d'imatges digitals (algoritmes digitals) prèviament desenvolupats pel nostre equip investigador i provats per la seva capacitat de quantificar els marcadors immunohistoquímics en càncer.^{124,137-139} La quantificació de les diferents poblacions immunes en cada cilindre es va calcular com el percentatge d'àrea de tinció positiva de cada marcador immunològic respecte al total de l'àrea del cilindre (**figura 6**). Per a cada pacient, vàrem utilitzar la mitjana dels percentatges dels dos cilindres per a cada marcador tenyit. En els casos en què un dels cilindres es va perdre a causa d'una mala tinció, pèrdua de teixit o mala qualitat d'imatge, vam utilitzar la informació d'un sol cilindre.

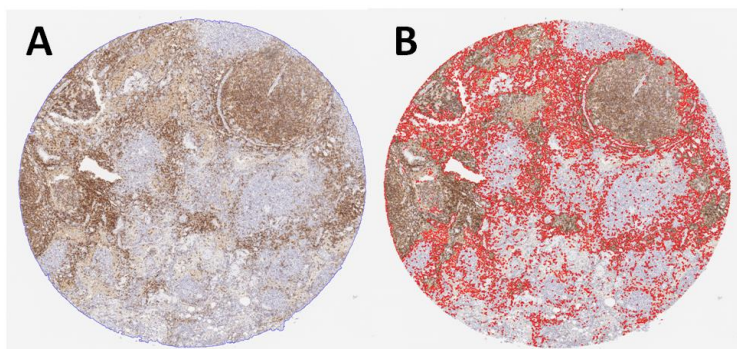


Figura 6. Representació visual final del procediment de quantificació automatitzada de l'àrea total del cilindre delimitada en blau (A) i de les àrees de tinció DAB positiva seleccionada dins del cilindre i delimitada en vermell (B).



4.5. Variables

La variable depenent principal de l'estudi va ser "Estatus patològic axil·lar" amb dos valors: pdGLA⁺ i pdGLA⁻ (taula 2). Hem definit com pdGLA⁺ com aquella pacient amb CM que presenta macro o micrometàstasi a l'estudi histopatològic en qualsevol dels ganglis axil·lars, ja sigui GLS o no. Hem definit com pdGLA⁻ com aquella pacient amb CM que no presenta macro ni micrometàstasi en els ganglis limfàtics axil·lars. De la totalitat de les pacients estudiades, només dues presentaven cèl·lules tumorals aïllades i aquestes dues s'acompanyaven de macrometàstasi pel que van estar catalogades com pdGLA⁺. Les variables clíniques i patològiques independents que es van estudiar per veure la seva possible associació amb la variable dependent van ser les següents: edat, diàmetre tumoral, LVI, invasió perineural (PNI: en anglès Perineural Invasion), grau histològic, estatus dels RE, estatus dels RP, estatus de l'HER2, índex de proliferació (Ki67), estatus menopàusic i el subtipus molecular subrogat. També es va avaluar l'OS, la supervivència específica de càncer (CSS: en anglès Cancer Specific Survival) i el temps fins a la progressió (TTP: en anglès Time To Progression) després de deu anys de seguiment (taula 2). L'OS es va definir com el temps des del diagnòstic histològic fins al final del seguiment o fins a la mort per qualsevol causa; la CSS es va definir com el temps des del diagnòstic histològic fins al final del seguiment/mort per una causa diferent del càncer o la mort a causa del CM; el TTP es va definir com el temps des de la data del diagnòstic histològic fins al final del seguiment o fins que la malaltia va començar a estendre's a altres parts del cos.

Taula 2. Llistat i especificació de les variables de l'estudi

Variables	Tipus de variable	Unitats o Categories
Variable dependent principal		
Estat axil·lar patològic	Qualitativa, dicotòmica	pdGLA ⁺ (Pacients amb GLA ⁺) pdGLA ⁻ (Pacients sense GLA ⁺)
Variables clíniques i patològiques independents		
Edat	Quantitativa, continua	Anys
Estat menopàusic	Qualitativa, dicotòmica	Pre-menopàusica /menopàusica
Diàmetre tumoral	Quantitativa, discreta	Mil·límetre
Grau histològic	Qualitativa, ordinal	G1, G2 o G3 ¹⁴⁰
Invasió limfovascular	Qualitativa, dicotòmica	Present / Absent
Invasió perineural	Qualitativa, dicotòmica	Present / Absent
Receptors d'estrògens	Qualitativa, dicotòmica	Positiu / Negatiu
Receptors de progesterona	Qualitativa, dicotòmica	Positiu / Negatiu
Índex de proliferació (Ki67)	Qualitativa, ordinal	Baix (<10%) Intermedi (10-25%) Alt (>25%)
Estat d'HER2	Qualitativa, dicotòmica	Positiu/ Negatiu
Subtipus molecular subrogat	Qualitativa, nominal	Luminal A, luminal B, HER2 i triple negatiu ⁷
Estat actual*	Qualitativa; nominal	Viu sense malaltia, Viu amb malaltia, Mort per malaltia o complicacions del tractament, Mort per altres causes.
Supervivència global (OS)	Quantitativa, continua	Número mesos
Super. específica càncer (DFS)	Quantitativa, continua	Número mesos
Temps fins a la progressió (TTP)	Quantitativa, continua	Número mesos

*Variable obtinguda per cada estatut de supervivència (OS, DFS, TTP)



4.6. Anàlisi estadístic

Les diferències entre les concentracions mitjanes o medianes de les diferents poblacions de cel·lularitat immune estudiades entre pdGLA^+ i pdGLA^- es van avaluar en el tumor primari i en els GLA^- , utilitzant les proves t-Student o la U de Mann-Whitney, segons condicions d'aplicació. Les mateixes proves es van utilitzar per avaluar les diferències entre els dos grups en les variables clíniques i patològiques quantitatives (edat i diàmetre del tumor). La prova de Khi-quadrat o l'estadístic exacte de Fisher es van utilitzar per identificar diferències en les freqüències de les variables clíniques i patològiques categòriques (LVI, PNI, grau histològic, estatus de RE, PR i HER2, Ki67, estatus menopàusic i subtipus molecular subrogat) entre els dos grups de pacients.

Es van desenvolupar dos models de regressió logística multivariant per identificar quines de les variables clíniques i patològiques i quines de les poblacions de cèl·lules immunitàries presents en el tumor primari i en els GLA^- estaven associades a tenir o no tenir GLA^+ al diagnòstic (pdGLA^+ vs. pdGLA^-). En primer lloc, es va establir una **regressió logística univariant** per a cada variable per estimar l'oportunitat relativa (OR: en anglès Odds Ratio) i el seu interval de confiança al 95% (CI: en anglès Confidence Interval). Totes les variables amb significació de $p \leq 0,1$ en l'anàlisi univariant es van incloure en la creació del primer model multivariant. En el segon model multivariant, les variables amb una OR molt elevada no es van incloure amb la intenció de comprovar si podrien emmascarar l'efecte d'altres variables que també podrien estar associades amb la presència de GLA^+ al diagnòstic. La bondat d'ajust de totes les variables considerades en les



anàlisis multivariants es va comprovar mitjançant la prova d'Hosmer-Lemeshow. Es va avaluar la capacitat d'aquests models per assignar correctament les pacients als grups de $pdGLA^+$ o $pdGLA^-$, utilitzant la sensibilitat, especificitat i les **corbes ROC** (en anglès: Receiver Operating Characteristic). Es van identificar les diferències estadísticament significatives en l'àrea sota la corba (AUC: en anglès Area Under de Curve) entre les diferents corbes ROC utilitzant la prova desenvolupada per DeLong ER et al.¹⁴¹ Els models generats van ser validats mitjançant la tècnica de simulació Bootstrapping del programa IBM SPSS Statistics 21.0 amb un CI del 95%. El nombre de mostres utilitzades per a la simulació va ser de 10.000.

La distribució dels **temps de supervivència** (OS, CSS, TTP) després de deu anys de seguiment es van estimar pel mètode Kaplan-Meier i es va comparar entre $pdGLA^+$ i $pdGLA^-$ utilitzant la prova de Log-rank. Les diferències en els temps de supervivència també es van comparar entre les pacients que foren predites com GLA^+ ($ppGLA^+$) i les pacients predites sense GLA^+ ($ppGLA^-$) pels dos models diferents de regressió logística multivariant. Finalment, per a cada model, es van comparar els temps de supervivència en el grup $pdGLA^+$ entre aquelles pacients predites correctament com $ppGLA^+$ i les predites incorrectament com $ppGLA^-$. En el grup de $pdGLA^-$, es van comparar també els temps de supervivència d'aquelles pacients predites correctament com $ppGLA^-$ i les predites incorrectament com $ppGLA^+$. En totes les anàlisis, els valors de $p < 0,05$ es van considerar estadísticament significatius. Totes les anàlisis estadístiques es van realitzar amb els programes informàtics IBM SPSS Statistics 21.0 (IBM, Armonk, NY, USA) i STATA 14.0 (StataCorp LLC, College Station, TX, USA).



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI



FUNDACIÓ DOCTOR FERRAN

CEL·LULARITAT IMMUNE ALS GANGLIS AXIL·LARS NEGATIUS

DE PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA



INSTITUT
D'INVESTIGACIÓ
SANITÀRIA
PERE VIRGILI



Hospital de Tortosa
Verge de la Cinta

RESULTATS



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI



FUNDACIÓ DOCTOR FERRAN

CEL·LULARITAT IMMUNE ALS GANGLIS AXIL·LARS NEGATIUS

DE PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA



INSTITUT
D'INVESTIGACIÓ
SANITÀRIA
PERE VIRGILI

HTVC

Hospital de Tortosa
Verge de la Cinta

5 . RESULTATS

5.1. Diferències clinicopatològiques

La **taula 3** mostra les diferències en les variables clíniques i patològiques entre els dos grups de pacients. Les pdGLA⁺ tenien tumors significativament més grans, percentatges més alts de LVI i PNI, i un grau histològic més alt que les pdGLA⁻.

5.2. Diferències en la cel·lularitat immune

Les **diferències en la concentració de poblacions de cel·lularitat immune** calculades amb els procediments d'anàlisi d'imatges digitals entre els dos grups de pacients es resumeixen a la **taula 4**. No es van trobar diferències significatives en el tumor primari, tret de les DC fol·liculars CD21⁺, presents amb una major concentració en les pdGLA⁺. Per altra banda, es van detectar diverses diferències significatives en les poblacions de cèl·lules immunes dels GLA⁻ entre les pdGLA⁺ i les pdGLA⁻. Es va detectar una major concentració de CD8, CD68 i S100 als GLA⁻ de les pdGLA⁺, en canvi la concentració de CD123 va ser inferior respecte a les pdGLA⁻.

Taula 3: Diferències en les variables clíniques i patològiques entre les pdGLA⁻ i les pdGLA⁺.

	pdGLA ⁻ (n=75)	pdGLA ⁺ (n=66)	p
Edat (anys)	61,2 (10,6)	59,7 (12,0)	0,434*
Diàmetre del tumor (mm)	15,0 (13,0)	22,0 (13,0)	<0,001 [†]
Invasió vascular (LVI)			
Present	8 (12,1%)	57 (77,0%)	<0,001 [‡]
Absent	58 (87,9%)	17 (23,0%)	
Invasió perineural (PNI)			
Present	10 (15,2%)	30 (40,5%)	0,001 [‡]
Absent	56 (84,8%)	44 (59,5%)	
Grau histològic			
1	22 (33,3%)	8 (10,7%)	0,002 [‡]
2	28 (42,4%)	34 (45,3%)	
3	16 (24,3%)	33 (44,0%)	
Receptors d'estrògens			
Positiu	48 (72,7%)	53 (70,7%)	0,787 [‡]
Negatiu	18 (27,3%)	22 (29,3%)	
Receptors de progesterona			
Positiu	43 (65,2%)	41 (54,7%)	0,206 [‡]
Negatiu	23 (34,8%)	34 (45,3%)	
Estatu HER2			
Amplificat	16 (24,6%)	20 (26,7%)	0,782 [‡]
No amplificat	49 (75,4%)	55 (73,3%)	
Índex de proliferació (Ki67)			
Baix	23 (34,9%)	16 (21,9%)	0,184 [‡]
Intermedi	22 (33,3%)	25 (34,3%)	
Alt	21 (31,8%)	32 (43,8%)	
Estatu menopàusic			
Pre-menopàusica	6 (9,8%)	15 (22,1%)	0,060 [‡]
Menopàusica	55 (90,2%)	53 (77,9%)	
Subtipus molecular subrogat			
Luminal A	42 (64,6%)	46 (61,4%)	0,983 [‡]
Luminal B	8 (12,3%)	10 (13,3%)	
HER2	8 (12,3%)	10 (13,3%)	
Triple-negatiu	7 (10,8%)	9 (12,0%)	

HER2: Human Epidermal growth factor Receptor 2.

Nota: Les proves estadístiques utilitzades per a les diferents comparacions són la prova t-Student* [mitjana (desviació estàndard)], la prova U de Mann-Whitney[†] [mediana (rang interquartil)] i la Khi-quadrat o la prova exacta de Fisher[‡] [n (%)].

Taula 4: Comparació de les poblacions immunes en el tumor primari i en els GLA⁻ entre les pdGLA⁻ i les pdGLA⁺.

	pdGLA ⁻ (n=75)	pdGLA ⁺ (n=66)	p
Tumor primari			
CD4	1,0 (2,4)	0,8 (1,5)	0,160 [†]
CD8	1,1 (2,8)	1,3 (2,6)	0,872 [†]
FOXP3	0,1 (0,2)	0,1 (0,2)	0,432 [†]
CD57	0,1 (0,3)	0,2 (0,5)	0,151
CD68	2,8 (3,6)	2,8 (2,3)	0,748 [†]
CD21	0,000 (0,002)	0,016 (0,04)	<0,001[†]
CD1a	0,1 (0,3)	0,1 (0,2)	0,315 [†]
S100	0,1 (0,4)	0,2 (0,3)	0,369 [†]
CD123	0,00 (0,04)	0,00 (0,03)	0,975 [†]
CD208	0,02 (0,08)	0,03 (0,15)	0,225 [†]
CD83	0,1 (0,1)	0,1 (0,2)	0,568 [†]
GLA⁻			
CD4	56,9 (12,5)	54,0 (13,6)	0,218*
CD8	11,8 (9,4)	16,0 (8,3)	0,006[†]
FOXP3	2,2 (1,0)	2,3 (1,1)	0,575*
CD57	0,2 (0,2)	0,2 (0,3)	0,196
CD68	7,4 (5,0)	9,6 (5,7)	0,006[†]
CD21	0,8 (1,8)	0,7 (1,4)	0,250 [†]
CD1a	1,5 (2,7)	1,1 (3,2)	0,911 [†]
S100	3,6 (3,5)	5,0 (5,3)	0,009[†]
CD123	1,7 (2,1)	1,3 (1,6)	0,015[†]
CD208	0,2 (0,3)	0,3 (0,6)	0,134 [†]
CD83	1,1 (1,4)	0,9 (1,1)	0,354 [†]

Nota: Les proves estadístiques utilitzades per a les diferents comparacions són la prova t-Student* [mitjana (desviació estàndard)] i la prova U de Mann-Whitney[†] [mediana (rang interquartil)].

5.3. Models de regressió logística

La **taula 5a** i la **taula 5b** mostren els resultats de l'anàlisi de regressió logística univariant per les variables clíniques/patològiques i les de la cel·lularitat immune, respectivament.

Taula 5a: Anàlisi univariant de les variables clíniques i patològiques associades a GLA⁺.

	OR (95% CI)	p
Edat (anys)	0,99 (0,96-1,02)	0,431
Diàmetre del tumor (mm)	1,06 (1,02-1,10)	0,001
Invasió vascular (LVI)		
Present	24,31 (9,72-60,78)	<0,001
Absent	1,0	
Invasió perineural (PNI)		
Present	3,82 (1,69-8,65)	0,001
Absent	1,0	
Grau histològic		
3	5,67 (2,08-15,50)	0,001
2	3,34 (1,29-8,65)	0,013
1	1,0	
Receptors d'estrògens		
Positiu	0,90 (0,43-1,88)	0,787
Negatiu	1,0	
Receptors de progesterona		
Positiu	0,65 (0,33-1,27)	0,207
Negatiu	1,0	
Estatut HER2		
Amplificat	1,11 (0,52-2,39)	0,782
No amplificat	1,0	
Índex de proliferació (Ki67)		
Alt	2,19 (0,94-5,09)	0,068
Intermedi	1,63 (0,69-3,85)	0,262
Baix	1,0	
Estatut menopàusic		
Pre-menopàusica	0,39 (0,14-1,07)	0,067
Menopàusica	1,0	
Perfil molecular		
Luminal A	1,0	
Luminal B	1,14 (0,41-3,16)	0,799
HER-2	1,17 (0,40-3,43)	0,770
Triple-negatiu	1,14 (0,41-3,16)	0,799

OR: Odds ratio, CI: Confidence Interval

Taula 5b: Anàlisi univariant de les variables immunes associades a GLA⁺.

	OR (95% CI)	p
Tumor primari		
CD4	0,97 (0,87-1,08)	0,558
CD8	0,99 (0,90-1,10)	0,900
FOXP3	1,00 (0,99-1,00)	0,160
CD57	1,02 (0,97-1,08)	0,403
CD68	0,95 (0,86-1,06)	0,341
CD21		
Presència	5,35 (2,54-11,30)	<0,001
Absència	1,0	
CD1a	0,90 (0,69-1,17)	0,432
S100	1,02 (0,88-1,19)	0,799
CD123	0,12 (0,00-10,76)	0,356
CD208	1,41 (0,66-3,03)	0,380
CD83	1,66 (0,18-14,97)	0,652
GLA⁻		
CD4	0,98 (0,96-1,01)	0,217
CD8	1,08 (1,02-1,14)	0,010
FOXP3	1,00 (1,00-1,00)	0,285
CD57	1,86 (0,45-7,77)	0,395
CD68	1,11 (1,02-1,21)	0,012
CD21	0,96 (0,81-1,14)	0,611
CD1a	1,01 (0,90-1,14)	0,856
S100	1,19 (1,05-1,35)	0,007
CD123	0,67 (0,50-0,90)	0,007
CD208	4,15 (1,29-13,38)	0,017
CD83	0,89 (0,67-1,18)	0,406

GLA⁺: gangli limfàtic axil·lar negatiu. , OR:Odds ratio, CI: Confidence Interval.

La **taula 6** mostra els resultats dels dos models multivariants. El test de bondat d'ajust de Hosmer i Lemeshow va mostrar un no ajust només per a la concentració de DC CD21⁺ (dades no mostrades), i per tant, la variable es va dicotomitjar com absent o present tant en l'anàlisi univariant com en el multivariant, en lloc de considerar-la com a variable contínua. En el cas de les variables clíniques i patològiques, la LVI és una de les variables més fortament associades amb la

presència de GLA⁺ al diagnòstic, per la qual cosa es va excloure del segon model multivariant per avaluar si aquesta variable podia estar emmascarant l'efecte d'altres que també podrien estar associades a la presència de GLA⁺ al diagnòstic. D'altra banda, la variable CD21 també va quedar exclòs d'aquest segon model multivariant perquè la seva absència va produir un model més parsimoniós. Les OR i els seus CI abans de treure la variable CD21 del model 2 eren: diàmetre del tumor (OR = 1,10; IC del 95%: 1,04 a 1,16; $p = 0,001$), els macròfags CD68⁺ dels GLA⁻ (OR = 1,25; IC del 95%: 1,07 a 1,46; $p = 0,006$), les DC CD123⁺ dels GLA⁻ (OR = 0,47; IC del 95%: 0,29 a 0,76; $p = 0,002$) i les DC S100⁺ dels GLA⁻ (OR = 1,24; IC del 95%: 1,04 a 1,47; $p = 0,019$). Les variables incloses al model 2, després d'eliminar CD21, no van canviar i les seves OR i el seu nivell de significació al model eren gairebé iguals (taula 6).

Taula 6: Anàlisi multivariant de les variables associades a GLA⁺.

	Model 1 OR (95% CI)	<i>p</i>	Model 2 OR (95% CI)	<i>p</i>
Diàmetre del tumor (mm)	1,16 (1,07-1,27)	<0,001	1,10 (1,04-1,17)	0,001
Invasió vascular (LVI)				
Positiva	171,2 (20,8-1411,2)	<0,001	-	-
Negativa	1,0			
CD21 intratumoral				
Presència	9,08 (1,80-45,88)	0,008	-	-
Absència	1,0			
CD68 dels GLA ⁻	1,24 (1,05-1,47)	0,013	1,27 (1,10-1,47)	0,001
CD123 dels GLA ⁻	-	-	0,44 (0,27-0,72)	0,001
S100 dels GLA ⁻	-	-	1,25 (1,06-1,47)	0,009

GLA: gangli limfàtic axil·lar. OR: Odds ratio, CI: Confidence Interval



Tal com s'aprecia a la **taula 6**, la comparació d'aquests dos models ens permet comprovar l'associació d'altres variables amb la presència de GLA⁺ al diagnòstic. Es pot observar que en el segon model (sense LVI i CD21) les concentracions de poblacions de DC S100⁺ (factor de risc) i pDC CD123⁺ (factor protector) en els GLA⁻ van ser noves variables associades a la presència de GLA⁺ al diagnòstic. Ambdós models es van validar mitjançant la simulació Bootstrap, després de la qual es va observar que les mateixes variables estaven presents en els models. Els resultats de la validació del model 1 van ser: el diàmetre del tumor (OR = 1,05; IC del 95%: 1,00 a 1,09; $p = 0,039$), la LVI (OR = 71,03; IC del 95%: 16,42 a 307,32; $p < 0,001$), les DC intratumoral CD21⁺ (OR = 7,59; CI del 95%: 1,97 a 29,16; $p = 0,003$), i els macròfags CD68⁺ al GLA⁻ (OR = 1,22; IC del 95%: 1,06 a 1,40; $p = 0,005$). En aquesta validació, la majoria dels resultats es van mantenir gairebé idèntics, tret de la LVI que va mostrar una reducció considerable de la seva OR. Els resultats de la validació del model 2 van ser: el diàmetre del tumor (OR = 1,08; IC del 95%: 1,03 a 1,14; $p = 0,001$), els macròfags CD68⁺ al GLA⁻ (OR = 1,27; IC del 95%: 1,11 a 1,44; $p < 0,001$), les pDC CD123⁺ al GLA⁻ (OR = 0,45; IC del 95%: 0,29 a 0,71; $p = 0,001$) i les DC S100⁺ al GLA⁻ (OR = 1,25; IC del 95%: 1,07 a 1,46; $p = 0,006$). En aquest segon model, les OR de totes les variables es van mantenir gairebé igual.

5.4. Models predictius i assignació de pacients als grups diagnosticats

Tal com s'ha esmentat a la secció de Mètodes, es van utilitzar models de regressió logística per avaluar la capacitat dels dos models d'assignar correctament les pacients als grups de pdGLA⁺ o pdGLA⁻. Ens referim amb pdGLA⁺ i pdGLA⁻ a aquelles pacients amb diagnòstic patològic de GLA⁺ o GLA⁻ respectivament i amb ppGLA⁺ i



ppGLA⁻ a aquelles pacients classificades pel model de regressió logística multivariant, dependent de les seves variables clíniques i patològiques i els seus patrons de cel·lularitat immune presents als GLA⁻. Es va assignar un estatus de classificació incorrecta a les pacients on la predicció del seu estatus dels GLA (ppGLA⁺ o ppGLA⁻) no concordava amb el seu estatus axil·lar diagnosticat (patològic) dels GLA (pdGLA⁺ o pdGLA⁻ respectivament).

Arribats a aquest punt, es va calcular la capacitat dels dos models de classificar correctament les pacients ppGLA⁺ al grup de pdGLA⁺ i les pacients ppGLA⁻ al grup de pdGLA⁻, mitjançant corbes ROC (**figura 7**). El model 1 tenia una sensibilitat del 83,9%, una especificitat del 90,0% i una AUC del 0,940 (CI del 95%: 0,901 al 0,970) mentre que el model 2 tenia una sensibilitat del 71,4%, una especificitat del 87,1% i una AUC del 0,840 (CI del 95%: 0,773 a 0,908). La diferència en l'AUC entre les dues versions del model 2 (amb CD21 o sense) era molt petita (1,9%) i la prova estadística de DeLong et al,¹⁴¹ indicava que la diferència no era estadísticament significativa ($p = 0,1$), per la qual cosa el model 2 sense CD21 que era el més parsimoniós, es va considerar el definitiu com s'ha esmentat anteriorment. Quan es van comparar les corbes ROC, mitjançant el test de De Long et al, del model 1 i del model 2 es va trobar que hi havia diferència estadísticament significativa entre les dues AUC ($p = 0.01$), la qual cosa va indicar que el model 1 era millor que el model 2 en predir correctament l'estat dels GLA de les pacients.

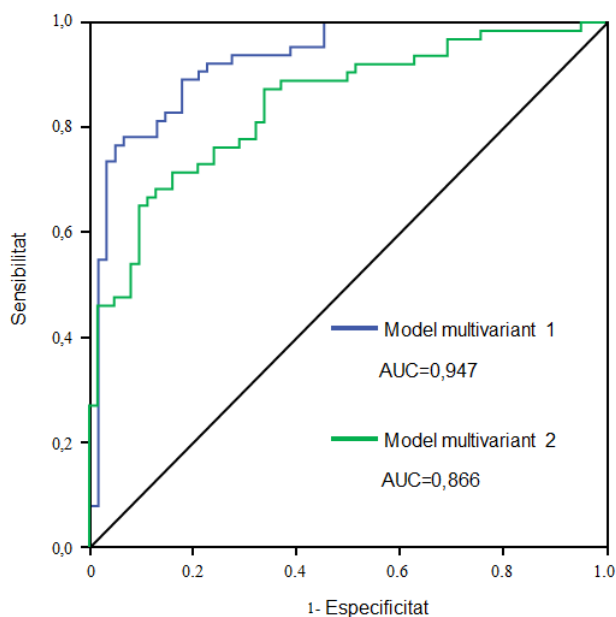


Figura 7. Corbes ROC dels dos models multivariants.

5.5. Models predictius i evolució de les pacients

Després d'haver avaluat la capacitat de predicció dels models, es van comparar els diferents temps de supervivència entre les $pdGLA^+$ i $pdGLA^-$, i entre les $ppGLA^+$ i $ppGLA^-$, per a cadascun dels dos models (**figura 8**).

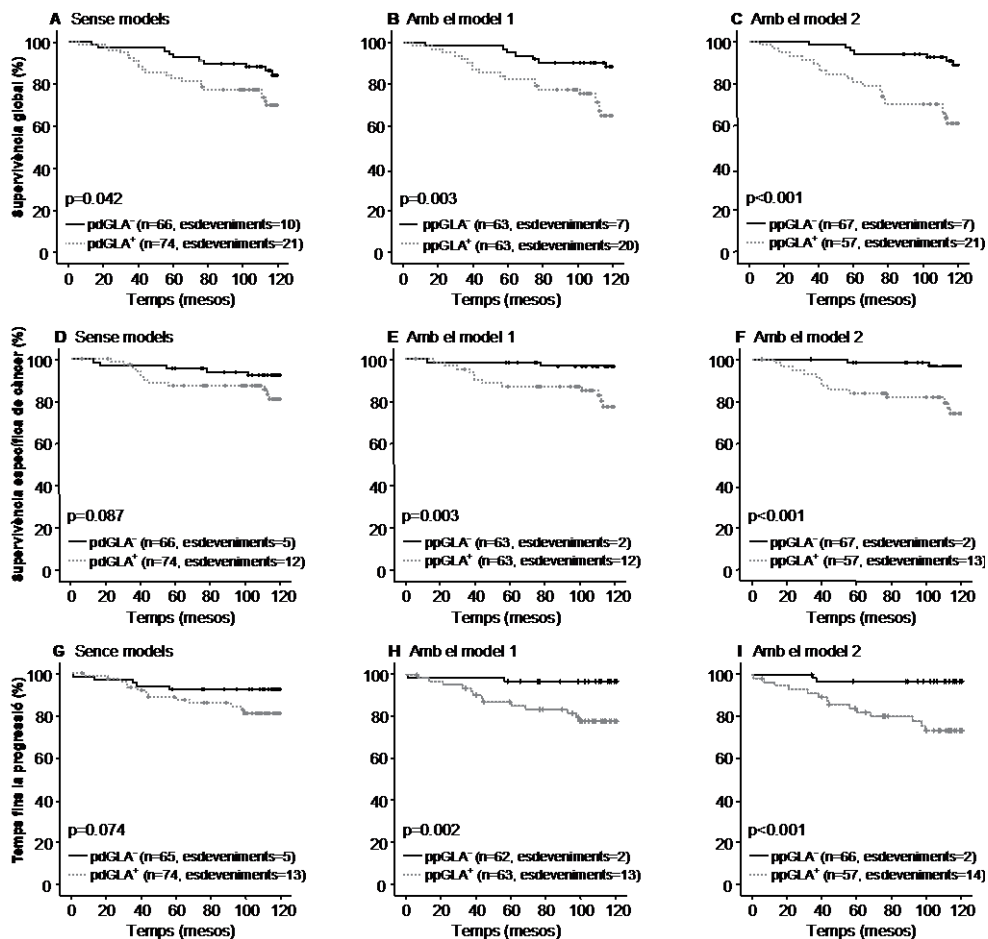


Figura 8. Corbes de supervivència Kaplan-Meier per a casos classificats com a pdGLA⁺ i pdGLA⁻ (sense models) i classificats com a ppGLA⁺ i ppGLA⁻ segons els dos models. Comparacions de les corbes Kaplan-Meier entre les pdGLA⁺ i pdGLA⁻ segons l'OS (A), la CSS (D) i el TTP (G). Comparació de les corbes Kaplan-Meier entre les ppGLA⁺ i ppGLA⁻ obtingudes amb el model 1 segons l'OS (B), la CSS (E) i el TTP (H). Comparació de les corbes Kaplan-Meier entre les ppGLA⁺ i ppGLA⁻ obtingudes amb el model 2 segons l'OS (C), la CSS (F) i el TTP (I).

Abreviacions: GLA⁺, gangli limfàtic axil·lar amb metàstasi al diagnòstic; GLA⁻, gangli limfàtic axil·lar sense metàstasi al diagnòstic; pdGLA⁺, pacients diagnosticades amb GLA⁺; pdGLA⁻, pacients diagnosticades amb GLA⁻; ppGLA⁺, pacients predites pels models com pacients amb GLA⁺; ppGLA⁻, pacients predites pels models com pacients amb GLA⁻; OS: Supervivència global, CSS: Supervivència específica de càncer, TTP: Temps fins a la progressió.

En tots els casos, les pdGLA⁻ i les ppGLA⁻ (línies negres contínues) van tenir millor evolució que les pdGLA⁺ i les ppGLA⁺ (línies grises discontinues), respectivament. Les diferències entre les corbes de supervivència del grup de pdGLA⁺ i del grup de pdGLA⁻ van ser del 13,2% per a l'OS, del 8,6% per la CSS i del 9,9% per al TTP. Les diferències entre les corbes de supervivència de les ppGLA⁺ i les ppGLA⁻ van ser més pronunciades per a les prediccions basades en el model 2 (26,4% per a l'OS, 19,8% per a la CSS i 21,6% per al TTP) que per a les basades en el model 1 (20,6% per a l'OS, 15,8% per a la CSS i 17,4% per al TTP) (**figura 8**). Així, tot i que el model 1 va ser millor predient correctament l'estat dels GLA de les pacients, el model 2 va ser millor en discriminar l'evolució de les pacients.

Per establir si el comportament clínic diferia entre pacients correctament i incorrectament classificades, es van comparar les seves corbes de l'OS, de la CSS i del TTP per al model 1 (**figura 9**) i per al model 2 (**figura 10**).

La fila superior de les dues figures mostra les pdGLA⁺ que foren correctament classificades com a ppGLA⁺ (en morat) i incorrectament classificades com a ppGLA⁻ (en roig). La fila inferior mostra les pdGLA⁻ que foren incorrectament classificades com a ppGLA⁺ (en morat) y correctament classificades com a ppGLA⁻ (en roig). En totes les gràfiques d'ambdues figures les corbes de supervivència de les pacients predites foren comparades amb les corbes de supervivència de les pdGLA⁻ (en blau) i les pdGLA⁺ (en verd) que foren considerades com les corbes de referència. Aquestes comparacions ens van permetre avaluar si les pacients predites tenien un comportament clínic similar al grup en el que havien estat classificades i diferent al grup oposat, independentment de si la predicció havia estat correcta o no.

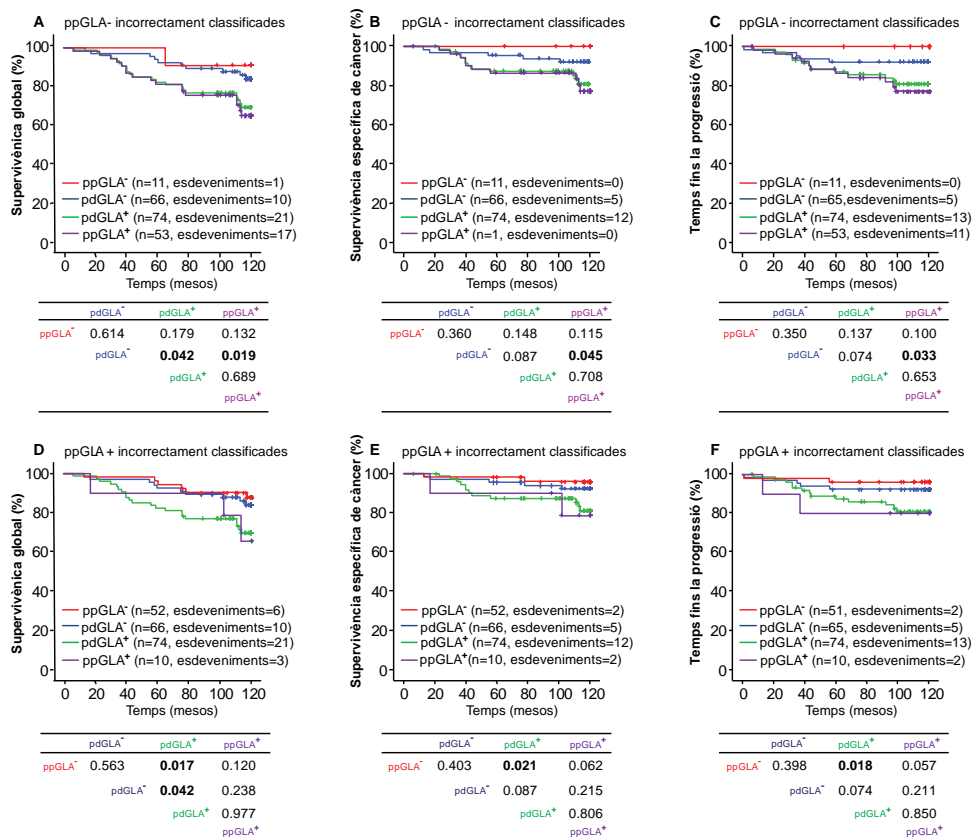


Figura 9. Comparacions de les corbes de supervivència Kaplan-Meier (OS, CSS, TTP) amb el log-rank test per al **model 1**. A-C: ppGLA⁺ correctament classificades i ppGLA⁺ incorrectament classificades dins del grup de les pdGLA⁺. D-F: ppGLA⁺ correctament classificades i ppGLA⁺ incorrectament classificades dins del grup de les pdGLA⁺. Els valors significatius del log-rank test apareixen en negreta per sota de cada figura corresponent.

Abreviacions: GLA⁺, gangli limfàtic axil·lar amb metàstasi al diagnòstic; GLA⁻, gangli limfàtic axil·lar sense metàstasi al diagnòstic; pdGLA⁺, pacients diagnosticades amb GLA⁺; pdGLA⁻, pacients diagnosticades amb GLA⁻; ppGLA⁺, pacients predites pels models com pacients amb GLA⁺; ppGLA⁻, pacients predites pels models com pacients amb GLA⁻; OS: Supervivència global, CSS: Supervivència específica de càncer, TTP: Temps fins la progressió.

En el model 1 (**figura 9**), les pacients incorrectament classificades no mostraven diferències estadísticament significatives en cap dels temps de supervivència en



comparació amb les pdGLA⁺ o les pdGLA⁻. A més les ppGLA⁻ incorrectament classificades (en roig, fila superior) no van mostrar diferències significatives en cap dels temps de supervivència avaluats en comparació amb el grup de les ppGLA⁺ correctament classificades (en morat, fila superior) ($p = 0,132$ per a OS, $p = 0,115$ per a CSS i $p = 0,100$ per a TTP). De la mateixa manera, les ppGLA⁺ incorrectament classificades (en morat, fila inferior) no van mostrar diferències significatives amb les ppGLA⁻ correctament classificades (en roig, fila inferior) ($p = 0,120$ per a OS, $p = 0,062$ per a CSS i $p = 0,057$ per a TTP). Aquests resultats indiquen que la classificació incorrecta no tenia cap efecte en el resultat clínic diferencial de les pacients. D'altra banda, com era d'esperar, les ppGLA⁺ correctament classificades (en morat, fila superior) van mostrar diferències significatives amb les pdGLA⁻ (en blau) però no amb les pdGLA⁺ (en verd). El mateix efecte es va observar per a les ppGLA⁻ correctament classificades (en roig, fila inferior) que van mostrar diferències significatives respecte a les pdGLA⁺ (en verd), però no respecte a les pdGLA⁻ (en blau).

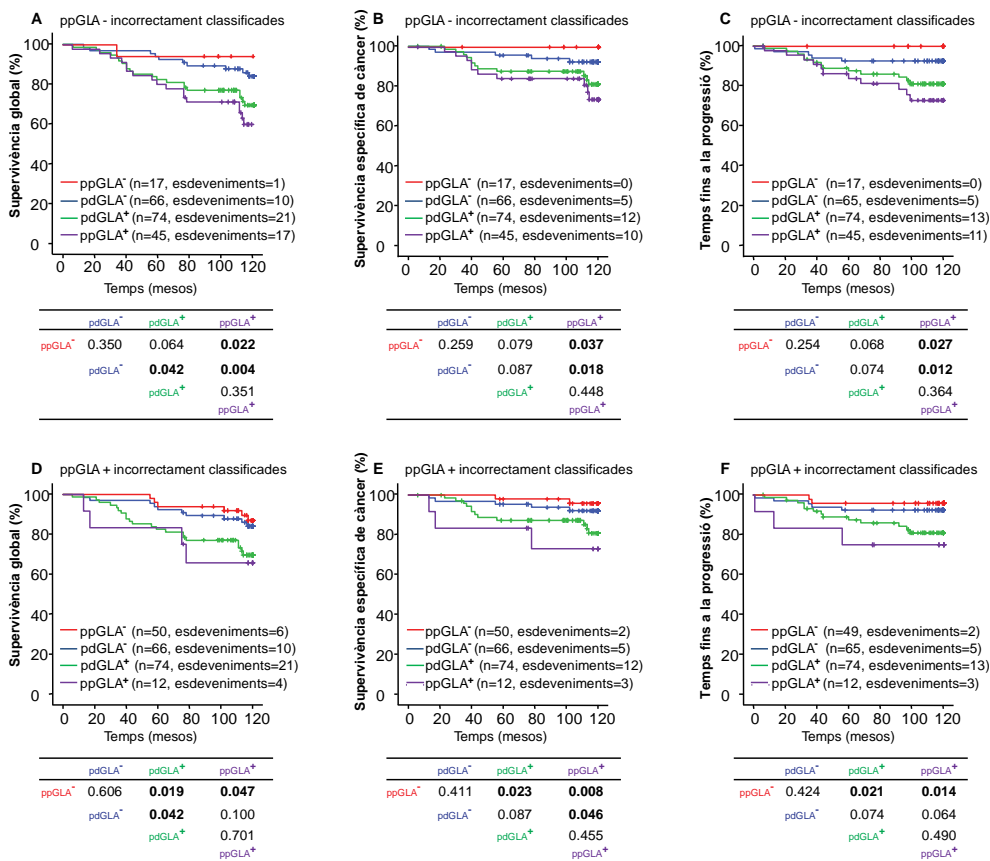


Figura 10. Comparacions de les corbes de supervivència Kaplan-Meier (OS, CSS, TTP) amb el log-rank test per al **model 2**. A-C: ppGLA⁺ correctament classificades i ppGLA⁻ incorrectament classificades dins del grup de les pdGLA⁺. D-F: ppGLA⁺ correctament classificades i ppGLA⁻ incorrectament classificades dins del grup de les pdGLA⁻. Els valors significatius del log-rank test apareixen en negreta per sota de cada figura corresponent.

Abreviacions: GLA⁺, gangli limfàtic axil·lar amb metàstasi al diagnòstic; GLA⁻, gangli limfàtic axil·lar sense metàstasi al diagnòstic; pdGLA⁺, pacients diagnosticades amb GLA⁺; pdGLA⁻, pacients diagnosticades amb GLA⁻; ppGLA⁺, pacients predites pels models com pacients amb GLA⁺; ppGLA⁻, pacients predites pels models com pacients amb GLA⁻; OS: Supervivència global, CSS: Supervivència específica de càncer, TTP: Temps fins a la progressió.



Al model 2 (**Figura 10**), les pacients correctament predites mostraven temps de supervivència significativament diferents dels seus grups oposat de pacients diagnosticades (ppGLA⁺ vs. pdGLA⁻ en la fila superior i ppGLA⁻ vs. pdGLA⁺ en la fila inferior), i no es van trobar diferències respecte al mateix grup de pacients diagnosticades amb el què van ser correctament classificades (ppGLA⁺ vs. pdGLA⁺ en la fila superior i ppGLA⁻ vs. pdGLA⁻ en la fila inferior). Les principals diferències entre el model 2 i el model 1 van ser que el model 2 mostrava diferències significatives en els temps de supervivència entre les ppGLA⁻ incorrectament classificades (en roig, fila superior) i les ppGLA⁺ correctament classificades (en morat, fila superior) i també entre ppGLA⁺ incorrectament classificades (en morat, fila inferior) i les ppGLA⁻ correctament classificades (en roig, fila inferior). Resultats similars es van detectar quan es van comparar les ppGLA⁻ incorrectament classificades amb el grup contrari de pdGLA⁺ (fila superior: roig vs. verd), i també entre les ppGLA⁺ incorrectament classificades amb les pdGLA⁻ (fila inferior: morat vs. blau). En la majoria d'aquestes darreres comparatives no es va obtenir diferències estadísticament significatives, però van tenir valors de p molt propers a la significació. Probablement, amb una mostra més gran de pacients incorrectament predites s'hagués aconseguit la significació estadística.

Així doncs, tal com es mostra a la fila superior, tot i que la gran majoria de les pdGLA⁺ es van classificar correctament com a ppGLA⁺, hi va haver un petit subgrup de pacients classificades incorrectament com a ppGLA⁻ amb una tendència clara a tenir un comportament clínic similar al de les pdGLA⁻. A més com es pot observar a la fila inferior, la gran majoria de les pdGLA⁻ també van ser correctament



classificades com a ppGLA⁻, però també hi havia un petit subgrup de pacients classificades incorrectament com a ppGLA⁺ amb clara tendència a tenir un comportament clínic similar al de les pdGLA⁺. Aquests resultats indiquen fortament que una classificació incorrecta té un efecte directe sobre la diferent evolució de les pacients.

5.6. Desenvolupament del model i efectes secundaris d'una classificació incorrecta

La classificació dels pacients en cadascun dels models de regressió logística es va

basar en la fórmula següent:

$$p = \frac{\exp(\alpha + \beta_1 X_1 + \dots + \beta_m X_m)}{1 + \exp(\alpha + \beta_1 X_1 + \dots + \beta_m X_m)}$$

Els valors de p oscil·len entre 0 i 1, i el punt de tall per pertànyer al grup de ppGLA⁻ fou $\leq 0,5$ i $> 0,5$ per a les ppGLA⁺. Els coeficients α i β són estimats pel model, i els valors de les X són donats per cadascuna de les pacients per a cadascuna de les variables incloses en cada model. α és una constant i les coeficients β es calculen pel model. Es calcula cada β per a cada variable. Per al model 1, β_1 era el diàmetre del tumor, β_2 era la LVI, β_3 era el CD21 intratumoral i β_4 era CD68 en els GLA⁻. Per al model 2, β_1 era el diàmetre del tumor, β_2 era CD68 en els GLA⁻, β_3 era CD123 en els GLA⁻ i β_4 era S100 en els GLA⁻. En cada model, aquests coeficients β eren constants per a totes les pacients i cada coeficient es multiplicava pel valor de la variable assignada (per exemple, β_1 , el coeficient del diàmetre del tumor, es multiplica per $X_1 = 10$ mm, el diàmetre del tumor d'una pacient. Els errors de predicció dels models de regressió logística van sorgir perquè els valors de les variables predictius (X_1, X_2, X_3, X_4) en pacients classificats incorrectament tenen valors més propers als de les pacients del grup contrari. En aquesta classificació



incorrecta, les pdGLA⁻ es van classificar com a ppGLA⁺ perquè les seves probabilitats derivades de la fórmula eren $>0,5$ en lloc de $\leq 0,5$. El mateix va passar amb les pdGLA⁺ incorrectament classificades com ppGLA⁻, ja que en el model les probabilitats per a aquests pacients eren $\leq 0,5$ en lloc de $>0,5$. Així doncs, els petits subgrups de pacients classificades incorrectament van sorgir del diàmetre del tumor (ambdós models), de la LVI (model 1) i de la concentració de les poblacions immunològiques a l'àrea intratumoral (model 1) i als GLA⁻ (tots dos models). Les diferències en les variables del model 2 entre pacients correctament i incorrectament predites també es confirmen parcialment per la comparació del diàmetre del tumor i les concentracions de poblacions immunes als GLA⁻ (CD68, S100 i CD123) (**taula 7**). En principi, la classificació incorrecta de les pacients no hauria de tenir altres efectes secundaris que no foren l'assignació incorrecta de les pacients a un determinat grup, tal com es va produir amb el primer model. Tanmateix, en el segon model, aquesta classificació errònia va tenir un efecte indirecte en el comportament clínic de les pacients, pel qual un primer petit subgrup de pdGLA⁺ classificades incorrectament com a ppGLA⁻ tenien patrons immunitaris en els GLA⁻ més semblants als GLA⁻ de les pdGLA⁻. Aquest petit subgrup de pdGLA⁺ també va mostrar un comportament clínic similar al del grup pdGLA⁻. Els resultats també van mostrar un segon petit subgrup de pdGLA⁻ classificades incorrectament com a ppGLA⁺, en les que els seus GLA⁻ tenien patrons immunes més similars als del GLA del grup pdGLA⁺. Aquest petit subgrup de pdGLA⁻ també va mostrar un comportament clínic similar al de les pdGLA⁺. En el model 1, la classificació incorrecta de les pacients no va tenir cap impacte en el seu

comportament clínic, però en el model 2, les pacients incorrectament classificades mostraven un comportament clínic similar al del grup en el qual foren incorrectament classificades. L'evolució diferent de les pacients incorrectament classificades podria ser simplement un efecte aleatori del model 2, però la influència de les variables sobre el resultat de les pacients no es va evidenciar en el model 1. A més, en el model 2, el canvi d'evolució clínic en els dos petits subgrups de pacients incorrectament classificades podria indicar que la composició de les poblacions immunes dels GLA⁻ podrien tenir un impacte indirecte en l'evolució de les pacients i ens porta a descartar la possibilitat d'efecte aleatori.

Taula 7: Comparació de les variables incloses en els dos models multivariants entre les pacients correctament i incorrectament classificades, amb o sense GLA⁺ al diagnòstic.

	pdGLA ⁻			pdGLA ⁺		
	ppGLA ⁻ correctament classificades	ppGLA ⁺ incorrectament classificades	p	ppGLA ⁺ correctament classificades	ppGLA ⁻ incorrectament classificades	p
Model 1	n=52	n=10		n=53	n=11	
Diàmetre tumor	15,0 (10,8)	25,0 (25,5)	0,003*	24,0 (15,5)	17,0 (14,0)	0,002*
LVI (%)	3,0 (5,8)	4,0 (40,0)	0,010[†]	48 (90,6)	2 (18,2)	<0,001[†]
CD21 tumor	0,0000 (0,0015)	0,0000 (0,0034)	0,174*	0,0155 (0,0447)	0,0191 (0,0495)	0,717*
CD68 GLA ⁻	7,4 (4,4)	8,1 (8,9)	0,909*	9,8 (5,2)	8,7 (9,6)	0,551*
Model 2	n=50	n=12		n=45	n=18	
Diàmetre tumor	13,5 (10,0)	24,5 (11,3)	0,001*	24,0 (22,5)	17,0 (13,5)	0,002*
CD68 GLA ⁻	7,4 (4,1)	8,8 (8,8)	0,581*	10,8 (6,7)	7,9 (5,1)	<0,001[†]
CD123 GLA ⁻	1,8 (2,2)	1,1 (1,3)	0,048*	1,5 (1,8)	1,2 (1,5)	0,717*
S100 GLA ⁻	3,2 (3,3)	4,8 (2,2)	0,226*	5,8 (5,2)	3,5 (3,3)	0,551*

Nota: Les dades i les proves estadístiques utilitzades per a les diferents comparacions són la mediana (rang interquartil) per la prova U de Mann-Whitney* i el nombre de pacients (%) per la prova exacta de Khi-quadrat o de Fisher[†].

Abreviacions: GLA: gangli limfàtic axil·lar, pd: pacients diagnosticades, pp: pacients predites pel model; LVI: invasió limfovacular.



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI



FUNDACIÓ DOCTOR FERRAN

CEL·LULARITAT IMMUNE ALS GANGLIS AXIL·LARS NEGATIUS

DE PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA



INSTITUT
D'INVESTIGACIÓ
SANITÀRIA
PERE VIRGILI



Hospital de Tortosa
Verge de la Cinta

DISCUSSIÓ



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI



FUNDACIÓ DOCTOR FERRAN

CEL·LULARITAT IMMUNE ALS GANGLIS AXIL·LARS NEGATIUS

DE PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA



INSTITUT D'INVESTIGACIÓ SANITÀRIA PERE VIRGILI

HTVC

Hospital de Tortosa
Verge de la Cinta



6. DISCUSSIÓ

Fins on sabem, aquest és el primer estudi que utilitza mostres en parafina per demostrar que els patrons de cel·lularitat immune dels GLA⁻ difereixen entre les pdGLA⁺ i les pdGLA⁻ en CM. El resultat més significatiu del present treball és que algunes d'aquestes diferències poden tenir implicacions clíniques en l'evolució de les pacients.

És ben sabut que diversos factors clínics i patològics utilitzats en la pràctica clínica actual estan associats a la presència de GLA⁺.¹⁴² Alguns estudis recents han demostrat altres trets histològics vinculats a la presència de metàstasi en els GLA i a la predicció de desenvolupar metàstasi a distància (lobel·litis limfocítica, mida i nombre o ubicació de centres germinals, etc.).¹⁴³ Aquestes noves variables podrien incorporar-se en el futur per avaluar l'evolució de les pacients amb CM. En aquest estudi s'han usat TMA que, com s'ha esmentat anteriorment, han estat i continuen sent àmpliament utilitzades en les avaluacions de biomarcadors en el microambient tumoral. Tanmateix, una limitació del nostre estudi és que amb l'ús de TMA és més difícil estudiar altres variables histològiques.¹⁴³ L'ús de factors patològics ben establerts i de nous, juntament amb les variables immunitàries i estromals, podrien fer possible una predicció més precisa de les pacients amb CM. En el nostre estudi, els principals factors clàssics associats amb la presència de GLA⁺ al diagnòstic detectats en les anàlisis univariants coincideixen amb els identificats per altres estudis (com la mida del tumor primari, grau histològic, LVI i PNI) que són, d'altra banda, les variables que s'utilitzen en la pràctica clínica



actual.^{142,144} Els nostres resultats suggereixen que la LVI emmascara altres variables associades al fet de tenir GLA⁺ al diagnòstic. Per tant, es va desenvolupar el segon model, excloent la LVI, per determinar quines altres variables estaven associades amb els GLA⁺.

El segon model fou pitjor a l'hora de classificar les pacients amb o sense GLA⁺, però tenia la qualitat especial que, les pacients incorrectament predites i encabides pel model en un grup en particular van tenir un comportament clínic similar a les pacients d'aquell grup. Aquestes pacients foren incorrectament classificades pel model degut a que els seus valors les variables predictores incloses en el model (mida del tumor i la composició immune dels seus GLA⁻) eren més similars al del grup oposat al qual realment pertanyien. Això ressalta com aquestes variables poden influir en la supervivència i la progressió del CM. Així, que el petit subgrup de pdGLA⁺, que el model incorrectament va classificar com pacients amb GLA⁻ (ppGLA⁻) tenien un comportament clínic similar a les pdGLA⁻. El mateix succeí amb el petit subgrup de pdGLA⁻, que el model incorrectament va classificar com pacients amb GLA⁺ (ppGLA⁺) i que van mostrar un comportament clínic similar a les pdGLA⁺.

Una possible explicació d'aquesta variació és que la presència del tumor als GLA modifica la cel·lularitat immune i la resposta immune dels GLA⁻ veïns, estenent la seva capacitat per produir alteracions immunes més enllà de la pròpia ubicació física del tumor en el GLA⁺, en la majoria dels casos.



No obstant això, una petita proporció de pdGLA⁺ que van ser classificats incorrectament com a ppGLA⁻ pel model 2 poden mantenir els seus patrons de cel·lularitat immune al GLA⁻ perquè el tumor al GLA⁺ no és capaç de modificar-los. Aquest manteniment del patró de cel·lularitat immune també pot ser responsable de la millor supervivència d'aquestes pacients.

Tanmateix, cal que hi hagi una explicació del que va passar en el grup reduït de pacients pdGLA⁻ que van ser classificats incorrectament com a ppGLA⁺ (6,8%), i que van tenir una supervivència similar a la del grup en què es trobaven classificades erròniament (pdGLA⁺). Una possible explicació és la presència de metàstasi oculta que podria alterar els patrons immunitaris dels GLA⁻ en aquest grup, provocant així una classificació incorrecta en el model 2. La metàstasi oculta s'ha estimat que es produeix en fins a un 20% dels pacients,³¹ i tot i que els resultats publicats fins ara no són conclouents, sembla que la seva presència podria estar associada a una pitjor DFS i OS,¹⁴⁵ tal com s'observa en aquest grup reduït de pacients predits incorrectament. Una altra possible explicació sorgeix dels resultats de Zuckerman i col·laboradors, que van demostrar que les modificacions/alteracions dels perfils d'expressió gènica de cèl·lules immunes en les pacients pdGLA⁺ i pdGLA⁻ es produeixen no només en el tumor primari i el GLA, sinó també en sang perifèrica.⁶⁰ Les diferències d'aquest grup de pdGLA⁻ que es classifiquen com ppGLA⁺ podrien ser la conseqüència del fet que les cèl·lules canceroses, que s'han escapat a la sang, siguin detectades per les cèl·lules immunes sistèmiques que, posteriorment, puguin alterar el patró de cel·lularitat immune als GLA; una cosa semblant també es podria produir als GLA⁻ de les pdGLA⁺ que encara no han estat envaïts, ja que



tenen un patró de resposta immune diferent al del GLA⁻ de les pdGLA⁻.⁶⁰ En aquest darrer cas, aquests canvis poden no ser produïts directament per un GLA⁺ veí, sinó per les cèl·lules immunes sistèmiques. Això implica que la detecció d'aquesta petita proporció de pacients més immunocompetents dins del grup de les pdGLA⁺ (amb GLA⁻ idèntic als de les pdGLA⁻), podria ser de gran importància per al seu seguiment.

Respecte a les diferents poblacions de cel·lularitat immune dels GLA, els resultats mostren que els macròfags CD68 són una de les poblacions immunes que es van mostrar rellevants en els GLA⁻. En CM, una alta densitat de TAMs s'ha correlacionat amb un pitjor pronòstic.¹⁴⁵ No obstant això, els macròfags M1 són capaços d'activar la resposta dels limfòcits T de tipus I; aquests també són citotòxics per a les cèl·lules neoplàstiques i són cèl·lules que afavoreixen la presentació d'antígens. Per contra, els macròfags M2 tenen una capacitat de presentació d'antígens més baixa, poden promoure l'angiogènesi i són capaços d'inhibir la resposta immune dels macròfags M1.⁸⁰ Per aquests motius, en càncer, es creu que la presència dels macròfags M2 és perjudicial.⁸² Els macròfags dels GLA⁻ no es consideren TAMs autèntics, ja que no es troben infiltrant al tumor primari; en canvi, la seva presència al GLA perifèric fa que es puguin considerar TAMs perifèrics. Tanmateix, l'augment de la concentració de TAMs perifèrics als GLA sembla estar associat a la presència del GLA⁺ al diagnòstic. Que la presència d'aquests TAMs perifèrics sembli estar associada a un pitjor pronòstic implica que també podrien estar polaritzats (fenotip M2), com també ho són els TAM presents en molts altres tipus de



càncer.^{146,147} S'hauria d'investigar en el futur una millor identificació dels tipus i funcions de les poblacions dels TAMs perifèrics en els GLA⁻.

Les altres dues poblacions de cel·lularitat immune presents als GLA⁻, que es van associar amb la presència de GLA⁺ al diagnòstic, eren les dues DC, específicament pDC CD123⁺ i DC interdigitants S100⁺. Les DC són reguladores clau de la resposta immune contra el càncer, ja que poden processar i presentar antígens associats a tumor, especialment en els ganglis limfàtics que drenen tumors,^{23,148} on les cèl·lules T es preparen i s'activen contra els antígens específics del càncer.¹⁴⁹ No obstant això, aquest cicle no sempre es completa degut al nivell de supressió immunològica local i sistèmica.^{23,149} Generalment, les pDC CD123 que infiltren el tumor s'associen a un mal pronòstic, ja que solen ser tolerogèniques i afavoreixen un microambient immunosupressor que activa les cèl·lules T reguladores en pacients amb CM i es correlacionen amb una pitjor evolució.^{100,150} Tanmateix, s'ha demostrat en el melanoma que les pDC CD123 poden promoure la resposta immune contra el tumor si s'estimulen adequadament.¹⁵¹ En CM, un estudi va trobar que no hi havien diferències de expressió de pDC CD123 entre els SLN⁺, SLN⁻ i GLA de persones sanes⁹⁹ mentre que un altre estudi es va evidenciar que els SLN⁻ tenien una expressió significativament més baixa de pDC CD123 al mateix temps que un nivell d'activació significament inferior de DC en comparació als GLA de persones sanes.³⁶ En el nostre estudi, sembla que un augment d'aquestes poblacions immunes està associat a ser un factor que protegeix contra els GLA⁺.

Finalment, les DC interdigitants S100⁺ són cèl·lules que provenen de la medul·la òssia i se situen en els dominis de les cèl·lules T de diversos teixits humans.¹⁵² Els



resultats són similars als observats per als macròfags on un increment de la concentració de les DC interdigitants S100⁺ està associada a tindre GLA⁺ al diagnòstic. Cap estudi ha avaluat si hi ha diferències en la concentració de S100 en el GLA⁻ entre les pacients pdGLA⁺ i les pacients pdGLA⁻ i no som coneixedors de cap estudi que hagi valorat les diferències entre GLA⁺ i GLA⁻ en CM.

Tenint en compte tots aquests resultats, les tres poblacions immunes identificades pel segon model s'associen, en aquest i altres estudis, a una resposta particular al càncer que pot ser un augment de la resposta immune contra les cèl·lules tumorals o induint un entorn tolerogen (de tolerància immune)^{23,27} que afecta el pronòstic del pacient.⁴⁴



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI



FUNDACIÓ DOCTOR FERRAN

CEL·LULARITAT IMMUNE ALS GANGLIS AXIL·LARS NEGATIUS

DE PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA



INSTITUT
D'INVESTIGACIÓ
SANITÀRIA
PERE VIRGILI



Hospital de Tortosa
Verge de la Cinta

CONCLUSIÓ



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI



FUNDACIÓ DOCTOR FERRAN

CEL·LULARITAT IMMUNE ALS GANGLIS AXIL·LARS NEGATIUS

DE PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA



ISP
INSTITUT
D'INVESTIGACIÓ
SANITÀRIA
PERE VIRGILI

HTVC

Hospital de Tortosa
Verge de la Cinta



7. CONCLUSIÓ

En conclusió, es considera que s'han aconseguit els objectius plantejats en aquest estudi amb resultats claus relacionats amb algunes poblacions de cel·lularitat immune dels GLA⁻:

- S'han avaluat els patrons de cel·lularitat immune en el tumor primari i en els GLA⁻, en dos grups de pacients amb CM, les pdGLA⁺ i les pdGLA⁻, mitjançant l'ús de TMA i IHQ, així com la detecció i quantificació dels marcadors tenyits per anàlisi automatitzada d'imatge digital.

- S'han avaluat les diferències en les concentracions de cèl·lules immunes detectades en el tumor primari i en els GLA⁻ en els dos grups de pacients estudiats. En el tumor primari, sols s'han observat diferències significatives en la població de DC fol·liculars CD21⁺. Per altra banda, als GLA⁻ es van detectar, de manera significativa, una major concentració de limfòcits T CD8⁺, macròfags CD68⁺ i DC interdigitants S100⁺ i, una menor concentració de pDC CD123⁺ en el grup de les pdGLA⁺ respecte al grup de les pdGLA⁻.

- S'han estudiat també les diferències en les variables clíniques i patològiques entre els dos grups de pacients estudiats. Les pdGLA⁺ han mostrat tenir tumors significativament més grans, percentatges més alts de LVI i PNI, i un grau histològic més alt que les pdGLA⁻.



- S'han generat 2 models de regressió logística multivariant amb capacitat predictiva de la presència de metàstasi axil·lar utilitzant les variables clíniques, patològiques i de cel·lularitat immune de les pacients. S'ha observat que algunes poblacions de cèl·lules immunes dels GLA⁻ estan més fortament associades al fet de tenir metàstasi en els GLA al diagnòstic que alguns factors patològics clàssics que també s'associen a GLA⁺, sobretot quan no es té en compte la LVI. Això és evident al segon model multivariant, ja que van quedar exclosos del model el grau histològic, la PNI i l'índex de proliferació, quan es van combinar amb aquestes poblacions immunes.

- S'han estudiat les diferències en la supervivència entre les pdGLA⁺ i pdGLA⁻ i les pacients predites amb i sense GLA⁺ (ppGLA⁺ i ppGLA⁻) pels models multivariants de regressió logística. S'ha observat que aquestes poblacions de cèl·lules immunes dels GLA⁻ poden estar associades amb l'evolució de les pacients en els petits subgrups de pacients predites incorrectament pel model 2. Aquests resultats indiquen que l'evolució del pacient pot dependre no només de si un pacient té GLA⁺, sinó també del tipus d'immunitat dels seus GLA⁻. Si les pdGLA⁺ tenen en els GLA⁻ patrons de cel·lularitat immune que s'assemblen més a les de les pdGLA⁻, també tendeixen a presentar un comportament clínic similar al del grup de les pdGLA⁻. Això també succeeix en la situació inversa, en la que les pdGLA⁻, a qui els patrons de cel·lularitat immune dels GLA⁻ són més similars a les de les pdGLA⁺ tendiran també a mostrar un comportament clínic similar al grup pdGLA⁺.



CEL·LULARITAT IMMUNE ALS GANGLIS AXIL·LARS NEGATIUS

DE PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA



- Finalment, els nostres resultats suggereixen una nova direcció en l'estudi de la CI en pacients amb CM, on no només el tumor primari i els GLA⁺ són importants sinó també els GLA⁻. Tot i que s'estan produint avenços importants amb els nous tractaments d'immunoteràpia, la investigació preclínica segueix sent necessària per comprendre perquè fracassen els assaigs clínics o simplement per saber què passa durant el desenvolupament del càncer.¹⁵³ L'estudi de la CI i/o resposta immune en els GL no afectats podria ser un dels factors claus. Aquest enfocament de l'estudi de poblacions immunes als GL negatius regionals també es podria adoptar en la investigació d'altres càncers, com el càncer colorectal i el melanoma, on l'estat immunitari dels GL negatius també podria ser un factor important relacionat amb l'evolució clínica dels pacients.



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI



FUNDACIÓ DOCTOR FERRAN

CEL·LULARITAT IMMUNE ALS GANGLIS AXIL·LARS NEGATIUS

DE PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA



ISP
INSTITUT
D'INVESTIGACIÓ
SANITÀRIA
PERE VIRGILI

HTVC

Hospital de Tortosa
Verge de la Cinta



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI



FUNDACIÓ DOCTOR FERRAN

CEL·LULARITAT IMMUNE ALS GANGLIS AXIL·LARS NEGATIUS

DE PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA



INSTITUT
D'INVESTIGACIÓ
SANITÀRIA
PERE VIRGILI



Hospital de Tortosa
Verge de la Cinta

BIBLIOGRAFIA



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI



FUNDACIÓ DOCTOR FERRAN

CEL·LULARITAT IMMUNE ALS GANGLIS AXIL·LARS NEGATIUS

DE PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA



ISP
INSTITUT
D'INVESTIGACIÓ
SANITÀRIA
PERE VIRGILI

HTVC

Hospital de Tortosa
Verge de la Cinta

8. BIBLIOGRAFIA

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68:394-424.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 2015;136:E359-86.
3. Howlader N, Noone AM, Yu M, Cronin KA. Use of imputed population-based cancer registry data as a method of accounting for missing information: application to estrogen receptor status for breast cancer. *Am J Epidemiol.* 2012;176:347-56.
4. Rakha EA, Allison KH, Ellis IO, Horii R, Masuda S, Penault-Llorca F, et al. Invasive breast cancer: General overview. In: series WCoT, editor. *Breast Tumours WHO Classification of Tumours.* 5th ed ed. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2019. p. 82-101.
5. Network CGA. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2012;490:61-70.
6. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000;406:747-52.
7. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thurlimann B, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer:

highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol.* 2013;24:2206-23.

8. Colomer R, Aranda-Lopez I, Albanell J, Garcia-Caballero T, Ciruelos E, Lopez-Garcia MA, et al. Biomarkers in breast cancer: A consensus statement by the Spanish Society of Medical Oncology and the Spanish Society of Pathology. *Clin Transl Oncol.* 2018;20:815-26.
9. Gatti-Mays ME, Balko JM, Gameiro SR, Bear HD, Prabhakaran S, Fukui J, et al. If we build it they will come: targeting the immune response to breast cancer. *NPJ Breast Cancer.* 2019;5:37.
10. Blumgart EI, Uren RF, Nielsen PM, Nash MP, Reynolds HM. Predicting lymphatic drainage patterns and primary tumour location in patients with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;130:699-705.
11. Dogan NU, Dogan S, Favero G, Kohler C, Dursun P. The Basics of Sentinel Lymph Node Biopsy: Anatomical and Pathophysiological Considerations and Clinical Aspects. *J Oncol.* 2019;2019:3415630.
12. Maguire A, Brogi E. Sentinel Lymph Nodes for Breast Carcinoma: A Paradigm Shift. *Arch Pathol Lab Med.* 2016;140:791-8.
13. Estourgie SH, Nieweg OE, Olmos RA, Rutgers EJ, Kroon BB. Lymphatic drainage patterns from the breast. *Ann Surg.* 2004;239:232-7.
14. Sato A, Sakai T, Iwase T, Kano F, Kimura K, Ogiya A, et al. Altered lymphatic drainage patterns in re-operative sentinel lymph node biopsy for ipsilateral breast tumor recurrence. *Radiat Oncol.* 2019;14:159.



15. Rinaldi RM, Sapra A, Bellin LS. Breast Lymphatics. StatPearls. Treasure Island (FL)2020.
16. Lorusso G, Ruegg C. New insights into the mechanisms of organ-specific breast cancer metastasis. *Semin Cancer Biol.* 2012;22:226-33.
17. Nathanson SD, Krag D, Kuerer HM, Newman LA, Brown M, Kerjaschki D, et al. Breast cancer metastasis through the lympho-vascular system. *Clin Exp Metastasis.* 2018;35:443-54.
18. Colzani E, Johansson AL, Liljegren A, Foukakis T, Clements M, Adolfsson J, et al. Time-dependent risk of developing distant metastasis in breast cancer patients according to treatment, age and tumour characteristics. *Br J Cancer.* 2014;110:1378-84.
19. Nienhuis HH, Gaykema SB, Timmer-Bosscha H, Jalving M, Brouwers AH, Lub-de Hooge MN, et al. Targeting breast cancer through its microenvironment: Current status of preclinical and clinical research in finding relevant targets. *Pharmacol Ther.* 2015;147C:63-79.
20. Spranger S, Spaapen RM, Zha Y, Williams J, Meng Y, Ha TT, et al. Up-regulation of PD-L1, IDO, and T(regs) in the melanoma tumor microenvironment is driven by CD8(+) T cells. *Sci Transl Med.* 2013;5:200ra116.
21. Burgos-Panadero R, Lucantoni F, Gamero-Sandemetrio E, Cruz-Merino L, Alvaro T, Noguera R. The tumour microenvironment as an integrated framework to understand cancer biology. *Cancer Lett.* 2019;461:112-22.



22. Bhat V, Allan AL, Raouf A. Role of the Microenvironment in Regulating Normal and Cancer Stem Cell Activity: Implications for Breast Cancer Progression and Therapy Response. *Cancers (Basel)*. 2019;11.
23. Gardner A, Ruffell B. Dendritic Cells and Cancer Immunity. *Trends Immunol*. 2016;37:855-65.
24. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*. 2012;21:309-22.
25. Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Andre F, Tesniere A, Kroemer G. The anticancer immune response: indispensable for therapeutic success? *J Clin Invest*. 2008;118:1991-2001.
26. López Marín JA, De La Cruz Merinao L, Rodrigue-Abreuz D, Arance Fernández A. Càncer y sistema inmunológico. *Bases de la inmunoteràpia del càncer*. Gética., editor: Transworld Editors, S.L. y Gética; 2018 Junio 2018.
27. Chen DS, Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature*. 2017;541:321-30.
28. Gajewski TF, Meng Y, Harlin H. Immune suppression in the tumor microenvironment. *J Immunother*. 2006;29:233-40.
29. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol*. 2014;27:16-25.
30. Rodriguez JA. HLA-mediated tumor escape mechanisms that may impair immunotherapy clinical outcomes via T-cell activation. *Oncol Lett*. 2017;14:4415-27.



CEL·LULARITAT IMMUNE ALS GANGLIS AXIL·LARS NEGATIUS

DE PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA



31. Bernet Vegue L, Cano Munoz R, Pinero Madrona A. Breast cancer sentinel lymph node and axillary lymphadenectomy: new tools for new challenges. *Expert Rev Mol Diagn.* 2012;12:147-58.
32. Jones D, Pereira ER, Padera TP. Growth and Immune Evasion of Lymph Node Metastasis. *Front Oncol.* 2018;8.
33. Gonzalez H, Hagerling C, Werb Z. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. *Genes Dev.* 2018;32:1267-84.
34. Paul S, Lal G. The Molecular Mechanism of Natural Killer Cells Function and Its Importance in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol.* 2017;8:1124.
35. Lavin Y, Merad M. Macrophages: gatekeepers of tissue integrity. *Cancer Immunol Res.* 2013;1:201-9.
36. van Pul KM, Vuylsteke R, van de Ven R, Te Velde EA, Rutgers EJT, van den Tol PM, et al. Selectively hampered activation of lymph node-resident dendritic cells precedes profound T cell suppression and metastatic spread in the breast cancer sentinel lymph node. *J Immunother Cancer.* 2019;7:133.
37. Hansen M, Andersen MH. The role of dendritic cells in cancer. *Semin Immunopathol.* 2017;39:307-16.
38. Zhu S, Yang N, Wu J, Wang X, Wang W, Liu Y-J, et al. Tumor microenvironment-related dendritic cell deficiency: a target to enhance tumor immunotherapy. *Pharmacological Research.* 2020;159:104980.
39. Gingras I, Azim HA, Jr., Ignatiadis M, Sotiriou C. Immunology and breast cancer: toward a new way of understanding breast cancer and developing novel therapeutic strategies. *Clin Adv Hematol Oncol.* 2015;13:372-82.



CEL·LULARITAT IMMUNE ALS GANGLIS AXIL·LARS NEGATIUS

DE PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA



40. Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, Muller BM, Komor M, et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28:105-13.
41. Gu-Trantien C, Loi S, Garaud S, Equeter C, Libin M, de Wind A, et al. CD4(+) follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *J Clin Invest.* 2013;123:2873-92.
42. Loi S. Tumor-infiltrating lymphocytes, breast cancer subtypes and therapeutic efficacy. *Oncoimmunology.* 2013;2:e24720.
43. Zhang SC, Hu ZQ, Long JH, Zhu GM, Wang Y, Jia Y, et al. Clinical Implications of Tumor-Infiltrating Immune Cells in Breast Cancer. *J Cancer.* 2019;10:6175-84.
44. de la Cruz-Merino L, Barco-Sanchez A, Henao Carrasco F, Nogales Fernandez E, Vallejo Benitez A, Brugal Molina J, et al. New insights into the role of the immune microenvironment in breast carcinoma. *Clin Dev Immunol.* 2013;2013:785317.
45. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002;420:860-7.
46. Soysal SD, Tzankov A, Muenst SE. Role of the Tumor Microenvironment in Breast Cancer. *Pathobiology.* 2015;82:142-52.
47. Badr NM, Berditchevski F, Shaaban AM. The Immune Microenvironment in Breast Carcinoma: Predictive and Prognostic Role in the Neoadjuvant Setting. *Pathobiology.* 2019:1-14.
48. Toss MS, Abidi A, Lesche D, Joseph C, Mahale S, Saunders H, et al. The prognostic significance of immune microenvironment in breast ductal carcinoma in situ. *Br J Cancer.* 2020.



49. Kerjaschki D. The crucial role of macrophages in lymphangiogenesis. *J Clin Invest.* 2005;115:2316-9.
50. Schoppmann SF, Birner P, Stockl J, Kalt R, Ullrich R, Caucig C, et al. Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. *Am J Pathol.* 2002;161:947-56.
51. Stacker SA, Williams SP, Karnezis T, Shayan R, Fox SB, Achen MG. Lymphangiogenesis and lymphatic vessel remodelling in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2014;14:159-72.
52. Padera TP, Meijer EF, Munn LL. The Lymphatic System in Disease Processes and Cancer Progression. *Annu Rev Biomed Eng.* 2016;18:125-58.
53. Zhang C, Gao L, Cai Y, Liu H, Gao D, Lai J, et al. Inhibition of tumor growth and metastasis by photoimmunotherapy targeting tumor-associated macrophage in a sorafenib-resistant tumor model. *Biomaterials.* 2016;84:1-12.
54. Nathanson SD, Shah R, Rosso K. Sentinel lymph node metastases in cancer: causes, detection and their role in disease progression. *Semin Cell Dev Biol.* 2015;38:106-16.
55. Ran S, Volk L, Hall K, Flister MJ. Lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in breast cancer. *Pathophysiology.* 2010;17:229-51.
56. Rotman J, Koster BD, Jordanova ES, Heeren AM, de Gruijl TD. Unlocking the therapeutic potential of primary tumor-draining lymph nodes. *Cancer Immunol Immunother.* 2019;68:1681-8.
57. Kim R, Emi M, Tanabe K, Arihiro K. Immunobiology of the sentinel lymph node and its potential role for antitumour immunity. *Lancet Oncol.* 2006;7:1006-16.



58. Zhao YC, Ni XJ, Wang MH, Zha XM, Zhao Y, Wang S. Tumor-derived VEGF-C, but not VEGF-D, promotes sentinel lymph node lymphangiogenesis prior to metastasis in breast cancer patients. *Med Oncol.* 2012;29:2594-600.
59. Kohrt HE, Nouri N, Nowels K, Johnson D, Holmes S, Lee PP. Profile of immune cells in axillary lymph nodes predicts disease-free survival in breast cancer. *PLoS Med.* 2005;2:e284.
60. Zuckerman NS, Yu H, Simons DL, Bhattacharya N, Carcamo-Cavazos V, Yan N, et al. Altered local and systemic immune profiles underlie lymph node metastasis in breast cancer patients. *Int J Cancer.* 2013;132:2537-47.
61. de Melo Gagliato D, Cortes J, Curigliano G, Loi S, Denkert C, Perez-Garcia J, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes in Breast Cancer and implications for clinical practice. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2017;1868:527-37.
62. Dieci MV, Radosevic-Robin N, Fineberg S, van den Eynden G, Ternes N, Penault-Llorca F, et al. Update on tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer, including recommendations to assess TILs in residual disease after neoadjuvant therapy and in carcinoma in situ: A report of the International Immuno-Oncology Biomarker Working Group on Breast Cancer. *Semin Cancer Biol.* 2018;52:16-25.
63. Gibert-Ramos A, Lopez C, Bosch R, Fontoura L, Bueno G, Garcia-Rojo M, et al. Immune response profile of primary tumour, sentinel and non-sentinel axillary lymph nodes related to metastasis in breast cancer: an immunohistochemical point of view. *Histochem Cell Biol.* 2019;152:177-93.



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI



FUNDACIÓ DOCTOR FERRAN

CEL·LULARITAT IMMUNE ALS GANGLIS AXIL·LARS NEGATIUS

DE PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA

INSTITUT
D'INVESTIGACIÓ
SANITÀRIA
PERE VIRGILIHospital de Tortosa
Verge de la Cinta

64. Matkowski R, Gisterek I, Halon A, Lacko A, Szewczyk K, Staszek U, et al. The prognostic role of tumor-infiltrating CD4 and CD8 T lymphocytes in breast cancer. *Anticancer Res.* 2009;29:2445-51.
65. La Rocca G, Anzalone R, Corrao S, Magno F, Rappa F, Marasa S, et al. CD1a down-regulation in primary invasive ductal breast carcinoma may predict regional lymph node invasion and patient outcome. *Histopathology.* 2008;52:203-12.
66. Miyama M, Schmidt-Mende J, Kiessling R, Poschke I, de Boniface J. Differential tumor infiltration by T-cells characterizes intrinsic molecular subtypes in breast cancer. *J Transl Med.* 2016;14:227.
67. Shou J, Zhang Z, Lai Y, Chen Z, Huang J. Worse outcome in breast cancer with higher tumor-infiltrating FOXP3+ Tregs : a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer.* 2016;16:687.
68. Nakamura R, Sakakibara M, Nagashima T, Sangai T, Arai M, Fujimori T, et al. Accumulation of regulatory T cells in sentinel lymph nodes is a prognostic predictor in patients with node-negative breast cancer. *Eur J Cancer.* 2009;45:2123-31.
69. Mansfield AS, Heikkila PS, Vaara AT, von Smitten KA, Vakkila JM, Leidenius MH. Simultaneous Foxp3 and IDO expression is associated with sentinel lymph node metastases in breast cancer. *BMC Cancer.* 2009;9:231.
70. Gokmen-Polar Y, Thorat MA, Sojitra P, Saxena R, Badve S. FOXP3 expression and nodal metastasis of breast cancer. *Cell Oncol (Dordr).* 2013;36:405-9.



71. Gupta M, Lorusso PM, Wang B, Yi JH, Burris HA, 3rd, Beeram M, et al. Clinical implications of pathophysiological and demographic covariates on the population pharmacokinetics of trastuzumab emtansine, a HER2-targeted antibody-drug conjugate, in patients with HER2-positive metastatic breast cancer. *J Clin Pharmacol.* 2012;52:691-703.
72. Kim JM, Chen DS. Immune escape to PD-L1/PD-1 blockade: seven steps to success (or failure). *Ann Oncol.* 2016;27:1492-504.
73. Baptista MZ, Sarian LO, Derchain SF, Pinto GA, Vassallo J. Prognostic significance of PD-L1 and PD-L2 in breast cancer. *Hum Pathol.* 2016;47:78-84.
74. Hou Y, Nitta H, Wei L, Banks PM, Lustberg M, Wesolowski R, et al. PD-L1 expression and CD8-positive T cells are associated with favorable survival in HER2-positive invasive breast cancer. *Breast J.* 2018;24:911-9.
75. Tatara T, Mukohara T, Shimono Y, Yamasaki T, Imamura Y, Funakoshi Y, et al. Expression of programmed death-1 in sentinel lymph nodes of breast cancer. *J Surg Oncol.* 2018;117:1131-6.
76. Liu Y, Dong Z, Jiang T, Hou L, Wu F, Gao G, et al. Heterogeneity of PD-L1 Expression Among the Different Histological Components and Metastatic Lymph Nodes in Patients With Resected Lung Adenosquamous Carcinoma. *Clin Lung Cancer.* 2018;19:e421-e30.
77. Muenst S, Soysal SD, Tzankov A, Hoeller S. The PD-1/PD-L1 pathway: biological background and clinical relevance of an emerging treatment target in immunotherapy. *Expert Opin Ther Targets.* 2015;19:201-11.



78. Qin T, Zeng YD, Qin G, Xu F, Lu JB, Fang WF, et al. High PD-L1 expression was associated with poor prognosis in 870 Chinese patients with breast cancer. *Oncotarget*. 2015;6:33972-81.
79. Kakavand H, Vilain RE, Wilmott JS, Burke H, Yearley JH, Thompson JF, et al. Tumor PD-L1 expression, immune cell correlates and PD-1+ lymphocytes in sentinel lymph node melanoma metastases. *Mod Pathol*. 2015;28:1535-44.
80. Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol*. 2009;86:1065-73.
81. Shiota T, Miyasato Y, Ohnishi K, Yamamoto-Ibusuki M, Yamamoto Y, Iwase H, et al. The Clinical Significance of CD169-Positive Lymph Node Macrophage in Patients with Breast Cancer. *PLoS One*. 2016;11:e0166680.
82. Mantovani A, Marchesi F, Malesci A, Laghi L, Allavena P. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14:399-416.
83. Aras S, Zaidi MR. TAMEless traitors: macrophages in cancer progression and metastasis. *Br J Cancer*. 2017;117:1583-91.
84. Zhang Y, Cheng S, Zhang M, Zhen L, Pang D, Zhang Q, et al. High-infiltration of tumor-associated macrophages predicts unfavorable clinical outcome for node-negative breast cancer. *PLoS One*. 2013;8:e76147.
85. Yuan ZY, Luo RZ, Peng RJ, Wang SS, Xue C. High infiltration of tumor-associated macrophages in triple-negative breast cancer is associated with a higher risk of distant metastasis. *Onco Targets Ther*. 2014;7:1475-80.



86. Gwak JM, Jang MH, Kim DI, Seo AN, Park SY. Prognostic value of tumor-associated macrophages according to histologic locations and hormone receptor status in breast cancer. *PLoS One*. 2015;10:e0125728.
87. Gul N, Grewal S, Bogels M, van der Bij GJ, Koppes MM, Oosterling SJ, et al. Macrophages mediate colon carcinoma cell adhesion in the rat liver after exposure to lipopolysaccharide. *Oncoimmunology*. 2012;1:1517-26.
88. Bogels M, Braster R, Nijland PG, Gul N, van de Luijngaarden W, Fijneman RJ, et al. Carcinoma origin dictates differential skewing of monocyte function. *Oncoimmunology*. 2012;1:798-809.
89. Jubb AM, Soilleux EJ, Turley H, Steers G, Parker A, Low I, et al. Expression of vascular notch ligand delta-like 4 and inflammatory markers in breast cancer. *Am J Pathol*. 2010;176:2019-28.
90. Yang J, Li X, Liu X, Liu Y. The role of tumor-associated macrophages in breast carcinoma invasion and metastasis. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8:6656-64.
91. Heiskala M, Leidenius M, Joensuu K, Heikkila P. High expression of CCL2 in tumor cells and abundant infiltration with CD14 positive macrophages predict early relapse in breast cancer. *Virchows Arch*. 2019;474:3-12.
92. Klingen TA, Chen Y, Aas H, Wik E, Akslen LA. Tumor-associated macrophages are strongly related to vascular invasion, non-luminal subtypes, and interval breast cancer. *Hum Pathol*. 2017;69:72-80.
93. Asano K, Nabeyama A, Miyake Y, Qiu CH, Kurita A, Tomura M, et al. CD169-positive macrophages dominate antitumor immunity by crosspresenting dead cell-associated antigens. *Immunity*. 2011;34:85-95.



94. Mansfield AS, Heikkila P, von Smitten K, Vakkila J, Leidenius M. The presence of sinusoidal CD163(+) macrophages in lymph nodes is associated with favorable nodal status in patients with breast cancer. *Virchows Arch.* 2012;461:639-46.
95. Burugu S, Asleh-Aburaya K, Nielsen TO. Immune infiltrates in the breast cancer microenvironment: detection, characterization and clinical implication. *Breast Cancer.* 2017;24:3-15.
96. Raschioni C, Bottai G, Sagona A, Errico V, Testori A, Gatzemeier W, et al. CXCR4/CXCL12 Signaling and Protumor Macrophages in Primary Tumors and Sentinel Lymph Nodes Are Involved in Luminal B Breast Cancer Progression. *Dis Markers.* 2018;2018:5018671.
97. Buldakov M, Zavyalova M, Krakhmal N, Telegina N, Vtorushin S, Mitrofanova I, et al. CD68+, but not stabilin-1+ tumor associated macrophages in gaps of ductal tumor structures negatively correlate with the lymphatic metastasis in human breast cancer. *Immunobiology.* 2017;222:31-8.
98. Waisman A, Lukas D, Clausen BE, Yogev N. Dendritic cells as gatekeepers of tolerance. *Semin Immunopathol.* 2017;39:153-63.
99. Mansfield AS, Heikkila P, von Smitten K, Vakkila J, Leidenius M. Metastasis to sentinel lymph nodes in breast cancer is associated with maturation arrest of dendritic cells and poor co-localization of dendritic cells and CD8+ T cells. *Virchows Arch.* 2011;459:391-8.



100. Treilleux I, Blay JY, Bendriss-Vermare N, Ray-Coquard I, Bachelot T, Guastalla JP, et al. Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2004;10:7466-74.
101. Gadalla R, Hassan H, Ibrahim SA, Abdullah MS, Gaballah A, Greve B, et al. Tumor microenvironmental plasmacytoid dendritic cells contribute to breast cancer lymph node metastasis via CXCR4/SDF-1 axis. *Breast Cancer Res Treat.* 2019;174:679-91.
102. Poindexter NJ, Sahin A, Hunt KK, Grimm EA. Analysis of dendritic cells in tumor-free and tumor-containing sentinel lymph nodes from patients with breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2004;6:R408-15.
103. Ammar A, Mohammed RA, Salmi M, Pepper M, Paish EC, Ellis IO, et al. Lymphatic expression of CLEVER-1 in breast cancer and its relationship with lymph node metastasis. *Anal Cell Pathol (Amst).* 2011;34:67-78.
104. Bembenek A, Li J, Loddenkemper C, Kemmner W, Stein H, Wernecke KD, et al. Presence of mature DC-Lamp+ dendritic cells in sentinel and non-sentinel lymph nodes of breast cancer patients. *Eur J Surg Oncol.* 2008;34:514-8.
105. Chang AY, Bhattacharya N, Mu J, Setiadi AF, Carcamo-Cavazos V, Lee GH, et al. Spatial organization of dendritic cells within tumor draining lymph nodes impacts clinical outcome in breast cancer patients. *J Transl Med.* 2013;11:242.
106. Shou D, Wen L, Song Z, Yin J, Sun Q, Gong W. Suppressive role of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) in the microenvironment of breast cancer and targeted immunotherapies. *Oncotarget.* 2016;7:64505-11.



CEL·LULARITAT IMMUNE ALS GANGLIS AXIL·LARS NEGATIUS

DE PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA



107. Toor SM, Syed Khaja AS, El Salhat H, Faour I, Kanbar J, Quadri AA, et al. Myeloid cells in circulation and tumor microenvironment of breast cancer patients. *Cancer Immunol Immunother.* 2017;66:753-64.
108. Diaz-Montero CM, Salem ML, Nishimura MI, Garrett-Mayer E, Cole DJ, Montero AJ. Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2009;58:49-59.
109. Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, Ling L, et al. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell.* 2009;16:183-94.
110. Wang Y, Chen J, Yang L, Li J, Wu W, Huang M, et al. Tumor-Contacted Neutrophils Promote Metastasis by a CD90-TIMP-1 Juxtacrine-Paracrine Loop. *Clin Cancer Res.* 2019;25:1957-69.
111. Wculek SK, Malanchi I. Neutrophils support lung colonization of metastasis-initiating breast cancer cells. *Nature.* 2015;528:413-7.
112. Ethier JL, Desautels D, Templeton A, Shah PS, Amir E. Prognostic role of neutrophil-to-lymphocyte ratio in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Res.* 2017;19:2.
113. Chen Y, Chen K, Xiao X, Nie Y, Qu S, Gong C, et al. Pretreatment neutrophil-to-lymphocyte ratio is correlated with response to neoadjuvant chemotherapy as an independent prognostic indicator in breast cancer patients: a retrospective study. *BMC Cancer.* 2016;16:320.



114. Peng Y, Butt YM, Chen B, Zhang X, Tang P. Update on Immunohistochemical Analysis in Breast Lesions. *Arch Pathol Lab Med.* 2017;141:1033-51.
115. Van Bockstal M, Floris G, Galant C, Lambein K, Libbrecht L. A plea for appraisal and appreciation of immunohistochemistry in the assessment of prognostic and predictive markers in invasive breast cancer. *Breast.* 2018;37:52-5.
116. Kalyuzhny AE. The dark side of the immunohistochemical moon: industry. *J Histochem Cytochem.* 2009;57:1099-101.
117. Pinder SE, Brown JP, Gillett C, Purdie CA, Speirs V, Thompson AM, et al. The manufacture and assessment of tissue microarrays: suggestions and criteria for analysis, with breast cancer as an example. *J Clin Pathol.* 2013;66:169-77.
118. Bolton KL, Garcia-Closas M, Pfeiffer RM, Duggan MA, Howat WJ, Hewitt SM, et al. Assessment of automated image analysis of breast cancer tissue microarrays for epidemiologic studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010;19:992-9.
119. Garcia Rojo M. State of the art and trends for digital pathology. *Stud Health Technol Inform.* 2012;179:15-28.
120. von Elm E, Altman DG, Egger M, Pocock SJ, Gotsche PC, Vandenbroucke JP. The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. *J Clin Epidemiol.* 2008;61:344-9.
121. Lopez C, Callau C, Bosch R, Korzynska A, Jaen J, Garcia-Rojo M, et al. Development of automated quantification methodologies of



- immunohistochemical markers to determine patterns of immune response in breast cancer: a retrospective cohort study. *BMJ Open*. 2014;4:e005643.
122. Peduzzi P, Concato J, Kemper E, Holford TR, Feinstein AR. A simulation study of the number of events per variable in logistic regression analysis. *J Clin Epidemiol*. 1996;49:1373-9.
123. Vittinghoff E, McCulloch CE. Relaxing the rule of ten events per variable in logistic and Cox regression. *Am J Epidemiol*. 2007;165:710-8.
124. Callau C, Lejeune M, Korzynska A, Garcia M, Bueno G, Bosch R, et al. Evaluation of cytokeratin-19 in breast cancer tissue samples: a comparison of automatic and manual evaluations of scanned tissue microarray cylinders. *Biomed Eng Online*. 2015;14 Suppl 2:S2.
125. Koo M, Squires JM, Ying D, Huang J. Making a Tissue Microarray. *Methods Mol Biol*. 2019;1897:313-23.
126. Pelekanou V, Villarroel-Espindola F, Schalper KA, Pusztai L, Rimm DL. CD68, CD163, and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) co-localization in breast tumor microenvironment predicts survival differently in ER-positive and -negative cancers. *Breast Cancer Res*. 2018;20:154.
127. Solinas C, Garaud S, De Silva P, Boisson A, Van den Eynden G, de Wind A, et al. Immune Checkpoint Molecules on Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Their Association with Tertiary Lymphoid Structures in Human Breast Cancer. *Front Immunol*. 2017;8:1412.



128. Ali HR, Provenzano E, Dawson SJ, Blows FM, Liu B, Shah M, et al. Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12,439 patients. *Ann Oncol.* 2014;25:1536-43.
129. Chavan SS, Ravindra S, Prasad M. Breast Biomarkers-Comparison on Whole Section and Tissue Microarray Section. *J Clin Diagn Res.* 2017;11:EC40-EC4.
130. Liu S, Foulkes WD, Leung S, Gao D, Lau S, Kos Z, et al. Prognostic significance of FOXP3+ tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer depends on estrogen receptor and human epidermal growth factor receptor-2 expression status and concurrent cytotoxic T-cell infiltration. *Breast Cancer Res.* 2014;16:432.
131. Schalper KA, Velcheti V, Carvajal D, Wimberly H, Brown J, Pusztai L, et al. In situ tumor PD-L1 mRNA expression is associated with increased TILs and better outcome in breast carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2014;20:2773-82.
132. Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruneri G, et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol.* 2015;26:259-71.
133. Lopez C, Bosch R, Orero G, Korzynska A, Garcia-Rojo M, Bueno G, et al. The Immune Response in Nonmetastatic Axillary Lymph Nodes Is Associated with the Presence of Axillary Metastasis and Breast Cancer Patient Outcome. *Am J Pathol.* 2020;190:660-73.
134. Bueno G, Fernandez-Carrobles MM, Deniz O, Garcia-Rojo M. New Trends of Emerging Technologies in Digital Pathology. *Pathobiology.* 2016;83:61-9.



135. Fernandez-Carrobles Mdel M, Bueno G, Deniz O, Salido J, Garcia-Rojo M. Automatic handling of tissue microarray cores in high-dimensional microscopy images. *IEEE J Biomed Health Inform.* 2014;18:999-1007.
136. Roszkowiak L, Lopez C. PATMA: parser of archival tissue microarray. *PeerJ.* 2016;4:e2741.
137. Lopez C, Lejeune M, Bosch R, Korzynska A, Garcia-Rojo M, Salvado MT, et al. Digital image analysis in breast cancer: an example of an automated methodology and the effects of image compression. *Stud Health Technol Inform.* 2012;179:155-71.
138. Korzynska A, Neuman U, Lopez C, Lejeune M, Bosch R. The Method of Immunohistochemical Images Standardization. *Choras RIPACC*, editor2010. 213-21 p.
139. Korzynska A, Roszkowiak L, Jakub Z, Lejeune M, Orero G, Bosch R, et al. The METINUS Plus method for nuclei quantification in tissue microarrays of breast cancer and axillary node tissue section. *Biomedical Signal Processing and Control*2017. p. 1-9.
140. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology.* 1991;19:403-10.
141. DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics.* 1988;44:837-45.



142. Patani NR, Dwek MV, Douek M. Predictors of axillary lymph node metastasis in breast cancer: a systematic review. *Eur J Surg Oncol.* 2007;33:409-19.
143. Grigoriadis A, Gazinska P, Pai T, Irhsad S, Wu Y, Millis R, et al. Histological scoring of immune and stromal features in breast and axillary lymph nodes is prognostic for distant metastasis in lymph node-positive breast cancers. *J Pathol Clin Res.* 2018;4:39-54.
144. Tseng HS, Chen LS, Kuo SJ, Chen ST, Wang YF, Chen DR. Tumor characteristics of breast cancer in predicting axillary lymph node metastasis. *Med Sci Monit.* 2014;20:1155-61.
145. Choi J, Gyamfi J, Jang H, Koo JS. The role of tumor-associated macrophage in breast cancer biology. *Histol Histopathol.* 2017:11916.
146. Alvaro T, Lejeune M, Camacho FI, Salvado MT, Sanchez L, Garcia JF, et al. The presence of STAT1-positive tumor-associated macrophages and their relation to outcome in patients with follicular lymphoma. *Haematologica.* 2006;91:1605-12.
147. Yuan R, Li S, Geng H, Wang X, Guan Q, Li X, et al. Reversing the polarization of tumor-associated macrophages inhibits tumor metastasis. *Int Immunopharmacol.* 2017;49:30-7.
148. da Cunha A, Michelin MA, Murta EF. Pattern response of dendritic cells in the tumor microenvironment and breast cancer. *World J Clin Oncol.* 2014;5:495-502.
149. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity.* 2013;39:1-10.



CEL·LULARITAT IMMUNE ALS GANGLIS AXIL·LARS NEGATIUS

DE PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA



150. Swiecki M, Colonna M. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nat Rev Immunol.* 2015;15:471-85.
151. Tel J, Aarntzen EH, Baba T, Schreibelt G, Schulte BM, Benitez-Ribas D, et al. Natural human plasmacytoid dendritic cells induce antigen-specific T-cell responses in melanoma patients. *Cancer Res.* 2013;73:1063-75.
152. Bodey B, Siegel SE, Kaiser HE. Antigen presentation by dendritic cells and their significance in antineoplastic immunotherapy. *In Vivo.* 2004;18:81-100.
153. The Lancet O. Calling time on the immunotherapy gold rush. *Lancet Oncol.* 2017;18:981.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Cel·lularitat immune als ganglis limfàtics axil·lars negatius en pacients amb càncer de mama

Ramon Bosch Príncep



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI



FUNDACIÓ DOCTOR FERRAN

CEL·LULARITAT IMMUNE ALS GANGLIS AXIL·LARS NEGATIUS

DE PACIENTS AMB CÀNCER DE MAMA



INSTITUT
D'INVESTIGACIÓ
SANITÀRIA
PERE VIRGILI

HTVC

Hospital de Tortosa
Verge de la Cinta

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Cel·lularitat immune als ganglis limfàtics axil·lars negatius en pacients amb càncer de mama

Ramon Bosch Princep



UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI