

**Asociación de linfocitos infiltrantes de tumores y variables intrínsecas tumorales con
severidad en biopsias y especímenes quirúrgicos de cáncer de mama establecida por escala
de Nottingham en laboratorio privado de patología 2022-2023.**

Ciro Arturo Páez Pérez

Trabajo de grado para optar por el título de Especialista en Patología

Director

Ernesto García Ayala

Médico Patólogo

Codirector

Tania Mendoza Herrera

Médica Internista

Asesor epidemiológico

Luis Alberto López Romero

Magíster en Epidemiología

**Universidad Industrial de Santander
Facultad de Salud – Escuela de Medicina
Departamento de Patología
Especialización en Patología
Bucaramanga**

2026

Agradecimientos

A Dios, quien en su infinita sabiduría y providencia pudo hacer posible que el esfuerzo y sacrificio llegara a buen puerto.

A mi esposa Carol y mis padres Germán y Esperanza, por su amor y apoyo incondicional.

A mis compañeros de residencia, pilares fundamentales, gracias por tantas sonrisas y buenos recuerdos, esenciales en los momentos de dificultad.

A la Universidad Industrial de Santander, en especial a los profesores del departamento de Patología por su guía, enseñanza y consejos.

A la Dra. Isabel Bolívar y su equipo de profesionales en el laboratorio privado Patología y Diagnóstico Especializado Isabel Bolívar Aguilera S.A.S, por permitirme llevar a cabo mi investigación.

Tabla de contenido

	Pág.
Introducción	14
1. Planteamiento y justificación del problema	14
1.1. Justificación	15
2. Estado del arte	15
2.1. Epidemiología del cáncer de mama	15
2.2. Patofisiología del cáncer de mama	16
2.3. Histopatología del cáncer de mama	16
2.4. Graduación histológica: escala de Nottingham	18
2.5. Subtipos moleculares	20
2.5.1. <i>Subtipo Luminal A</i>	20
2.5.2. <i>Subtipo Luminal B</i>	20
2.5.3. <i>Subtipo HER2</i>	21
2.5.4. <i>Subtipo TNBC</i>	22
2.6. Linfocitos infiltrantes de tumores (TILS)	22
3. Pregunta de investigación	27
4. Hipótesis de investigación	27
4.1. Hipótesis nula	27

ASOCIACIÓN DE LINFOCITOS INFILTRANTES DE TUMORES	4
4.2. Hipótesis alterna	27
5. Objetivos	28
5.1. Objetivo general	28
5.2. Objetivos específicos	28
6. Propósito	28
7. Metodología propuesta	29
7.1. Descripción del tipo del estudio	29
7.2. Población	29
7.2.1. <i>Población de referencia</i>	29
7.2.2. <i>Población blanco</i>	29
7.2.3. <i>Población de estudio (accesible)</i>	29
7.3. Tamaño de la muestra	30
7.4. Selección de los participantes	30
7.4.1. <i>Criterios de inclusión</i>	30
7.4.2. <i>Criterios de exclusión</i>	30
7.5. Definición de variables	31
8. Procedimientos para la recolección de la información	34
8.1. Materiales y métodos	34
8.1.1. <i>Evaluación de la calidad de la muestra: láminas rotas, o pérdida de la coloración</i>	34
8.1.2. <i>Interpretación de la evaluación de los TILs</i>	40

ASOCIACIÓN DE LINFOCITOS INFILTRANTES DE TUMORES	5
8.2. Análisis estadístico	40
8.2.1 Análisis univariado	40
8.2.2 Análisis bivariado	41
8.2.3 Análisis multivariado	41
9. Consideraciones éticas	42
9.1. Proceso para la información	43
10. Tratamiento de datos personales	44
11. Resultados	45
11.1 Análisis univariado	45
11.2 Análisis bivariado	60
11.3 Análisis multivariado	81
12. Discusión	83
12.1. TILS, grado histológico y subtipos moleculares	83
12.2. TILS, proliferación tumoral y receptores hormonales	84
12.3. Edad y respuesta inmune	85
12.4 Invasión linfovascular, grado histológico y localización	85
12.5. Interpretación general	86
13. Recomendaciones para otros futuros estudios	87
14. Conclusiones	87
15. Cronograma de actividades	89

ASOCIACIÓN DE LINFOCITOS INFILTRANTES DE TUMORES	6
16. Presupuesto	90
Referencias bibliográficas	91
Apéndices	95

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1: Enfoque estandarizado para la evaluación de TIL en cáncer de mama.(1)	25
Figura 2: Morfología, definiciones, relevancia biológica y diagnóstica de los diferentes infiltrados inmunes encontrados en el cáncer de mama.(1)	26
Figura 3: Tamaño muestral	30
Figura 4: Tipo de muestra	47
Figura 5: Edad	48
Figura 6: Localización	49
Figura 7: Subtipo histológico	50
Figura 8: Subtipos moleculares	51
Figura 9: Grado de Nottingham	52
Figura 10: KI-67	53
Figura 11: TILs	54
Figura 12: Receptores hormonales y HER-2	55
Figura 13: Invasión linfovascular	56
Figura 14: Invasión perineural	57
Figura 15: Ganglios	58
Figura 16: Tamaño tumoral	59
Figura 17: TILs y Nottingham	69
Figura 18: TILs y subtipos moleculares	69
Figura 19: TILs y KI-67	70

Figura 20: TILs y receptores hormonales	70
Figura 21: TILs y edad	71
Figura 22: Invasión linfovascular y localización	79
Figura 23: Invasión linfovascular y receptores hormonales	80
Figura 24: Invasión linfovascular y Nottingham	80
Figura 25: Curva ROC del modelo predictor de Nottingham severo	83
Figura 26: Cronograma de actividades	89
Figura 27: Presupuesto	90

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1: Definición de variables	31
Tabla 2: Tipo de muestra	47
Tabla 3: Edad	48
Tabla 4: Localización	49
Tabla 5: Subtipo histológico	50
Tabla 6: Subtipos moleculares	51
Tabla 7: Grado de Nottingham	52
Tabla 8: KI-67	53
Tabla 9: TILs	54
Tabla 10: Receptores hormonales y HER-2	55
Tabla 11: Invasión linfovascular	56
Tabla 12: Invasión perineural	57
Tabla 13: Ganglios	58
Tabla 14: Tamaño tumoral	59
Tabla 15: Análisis bivariado entre linfocitos infiltrantes de tumores y demás variables	62
Tabla 16: TILs e invasiones	71
Tabla 17: Análisis bivariado entre invasión linfovascular y demás variables.	72
Tabla 18: Análisis bivariado entre grado de Nottingham severo (pobremente diferenciado), edad menor o igual a 45 años, receptores de progesterona y nivel de TILs intermedios-altos	81
Tabla 19: Variables del modelo de predicción	82

Tabla 20: Desempeño del modelo

82

Lista de apéndices

	Pág.
Apéndice A: Instrumentos para la recolección de variables	95

Resumen

Título: Asociación de linfocitos infiltrantes de tumores y variables intrínsecas tumorales con severidad en biopsias y especímenes quirúrgicos de cáncer de mama establecida por escala de Nottingham en laboratorio privado de patología 2022-2023*

Autor: Ciro Arturo Páez Pérez**

Palabras clave: Linfocitos infiltrantes de tumor; Neoplasias de la mama; Pronóstico; Receptores de estrógenos; Receptores de progesterona; Receptor ErbB-2.

Objetivo: Determinar la asociación entre la expresión de TILs y otras variables intrínsecas tumorales con la severidad histológica en distintas variantes del cáncer de mama, a partir de especímenes recolectados entre 2022 y 2023.

Materiales y métodos: Se realizó un estudio analítico retrospectivo a partir de una base de datos secundaria, anonimizada, compuesta por láminas histológicas de pacientes con diagnóstico de cáncer de mama, correspondientes a biopsias, cuadrantectomías y mastectomías procesadas en el laboratorio privado Patología y Diagnóstico Especializado Isabel Bolívar Aguilera S.A.S., entre enero de 2022 y diciembre de 2023. Se incluyeron variables intrínsecas tumorales, sin requerir información clínica adicional. El estudio también estimó la prevalencia de estas variables según severidad e indicadores diagnósticos como sensibilidad y especificidad.

Resultados: Se analizaron 198 casos, con predominio del subtipo ductal invasor y Luminal A (n=89; 45,2%). La edad media fue de 61 años. TILs intermedios-altos se observaron en el 13,5% (n=22). En el análisis bivariado, los TILs elevados se asociaron con grado histológico alto, subtipo triple negativo, Ki-67 elevado, menor edad y ausencia de receptores hormonales. En el análisis multivariado, la edad ≤ 45 años (OR=3,49; IC95%: 1,15–10,59), TILs intermedios/altos (OR=5,66; IC95%: 1,97–16,25) y la negatividad para receptores de progesterona (OR=0,22; IC95%: 0,09–0,52) se mantuvieron como predictores independientes. El modelo mostró una especificidad del 96,8%, un AUC de 0,76 y una clasificación correcta del 83,4%.

Conclusiones: Los TILs se asociaron significativamente con la severidad histológica y subtipos moleculares. El modelo predictivo mostró utilidad potencial en la estratificación pronóstica.

*Trabajo de grado

**Facultad de Salud, Universidad Industrial de Santander, Escuela de Medicina, Departamento de Patología. Director: Ernesto García Ayala, Médico Especialista en Patología. Codirector: Tania Mendoza Herrera, Médico Especialista en Medicina Interna. Asesor epidemiológico: Luis Alberto López Romero, Magíster en Epidemiología.

Abstract

Title: Association of Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Intrinsic Tumor Variables with Severity in Breast Cancer Biopsies and Surgical Specimens Based on Nottingham Grading Scale in a Private Pathology Laboratory, 2022–2023*

Author: Ciro Arturo Páez Pérez**

Keywords: Lymphocytes, Tumor-Infiltrating; Breast Neoplasms; Prognosis; Receptors, Estrogen; Receptors, Progesterone; Receptor, ErbB-2.

Objective: To determine the association between TIL expression and other intrinsic tumor variables with histological severity across different breast cancer variants, based on specimens collected between 2022 and 2023.

Materials and Methods: A retrospective analytical study was conducted using a secondary, anonymized database composed of histological slides from patients diagnosed with breast cancer, corresponding to biopsies, quadrantectomies, and mastectomies processed at the private pathology laboratory Patología y Diagnóstico Especializado Isabel Bolívar Aguilera S.A.S., between January 2022 and December 2023. Intrinsic tumor variables were included, without requiring additional clinical information. The study also estimated the prevalence of these variables according to severity and diagnostic indicators such as sensitivity and specificity.

Results: A total of 198 cases were analyzed, with a predominance of the invasive ductal subtype and Luminal A molecular subtype (n=89; 45.2%). The mean age was 61 years. Intermediate-to-high TIL levels were observed in 13.5% (n=22) of cases. In bivariate analysis, elevated TILs were associated with high histological grade, triple-negative subtype, high Ki-67 index, younger age, and absence of hormone receptors. In multivariate analysis, age ≤ 45 years (OR=3.49; 95% CI: 1.15–10.59), intermediate/high TILs (OR=5.66; 95% CI: 1.97–16.25), and progesterone receptor negativity (OR=0.22; 95% CI: 0.09–0.52) remained as independent predictors. The model showed a specificity of 96.8%, an AUC of 0.76, and correctly classified 83.4% of the cases.

Conclusions: TILs were significantly associated with histological severity and molecular subtypes. The predictive model demonstrated potential usefulness for prognostic stratification.

*Degree work

** Faculty of Health Sciences, Universidad Industrial de Santander, School of Medicine, Department of Pathology. Advisor: Ernesto García Ayala, Physician and Specialist in Pathology. Co-advisor: Tania Mendoza Herrera, Physician and Specialist in Internal Medicine. Epidemiological Consultant: Luis Alberto López Romero, Master's Degree in Epidemiology.

Introducción

El informe de patología debe detallar específicamente los hallazgos diagnósticos, pronósticos y factores predictivos posibles, que se comunican al clínico, quien establece propuestas de manejo y sobrevida en base a esos hallazgos. Factores predictivos más sólidos y ampliamente estudiados como edad, subtipos histológicos/moleculares y tamaño tumoral se han estudiado durante mucho más tiempo y de manera más amplia, siendo relativamente reciente la descripción y asociación de los linfocitos infiltrantes de tumores (TILs) en el pronóstico en los cánceres de mama triple negativos(1).

Las células tumorales logran sobrevivir y perpetuarse gracias a su capacidad para evadir los mecanismos de control antitumorales propios del organismo, incluyendo especialmente los del sistema inmune, siendo esto descrito en la teoría de inmunoección del cáncer, en la que, a través de las fases de eliminación, equilibrio y escape, estas células tumorales al final generan nuevas variantes no reconocibles e insensibles al sistema inmune. Sin embargo, en este proceso de interacción continuo entre las células tumorales y las células del sistema inmune, la respuesta inmunitaria antitumoral evoluciona(2). Actualmente se ha logrado reconocer que los parámetros inmunes influyen de manera directa o no en la supervivencia del paciente, y con este conocimiento, se han encaminado terapias actuales a reactivar respuestas inmunes anticáncer.

1. Planteamiento y justificación del problema

1.1. Justificación

La presencia de TILs permite determinar directamente la respuesta inmunitaria antitumoral individual y su grado de infiltración en el tejido tumoral, encontrando con su uso una asociación directa con la supervivencia de pacientes lo cual ha resaltado su relevancia clínica como biomarcador inmunológico. De manera más precisa, la sola evaluación del grado de infiltración de TILs en cánceres de mama triple negativos (TNBC) con tinción de Hematoxilina-Eosina (HE) ha demostrado tener valor predictivo y pronóstico como ejemplifica el Grupo de Trabajo Internacional de TIL 2014, que recomendó el estudio de TILs estromales en carcinomas de mama triple negativos (receptor de estrógenos, receptor de progesterona y HER2 negativos), por su mal pronóstico y difícil manejo dada su pobre respuesta al manejo hormonal, con características histopatológicas desfavorables de mayor grado de compromiso, mayor tamaño tumoral y positividad en ganglios linfáticos(3). Es por esto que actualmente la investigación en mama se está centrando en evaluar factores, que desde el punto de vista inmunológico, permitan ofrecer nuevas opciones para las terapias de tratamiento, dado que los tumores TNBC se correlacionan con la infiltración inmune del tumor(4) encontrando de esta forma en los TILs su accionar como biomarcadores inmunológicos.

2. Estado del arte

2.1. Epidemiología del cáncer de mama

En el reporte de GLOBOCAN 2022, el cáncer de mama femenino es una de las neoplasias más frecuentes a nivel mundial, con un estimado de 2,3 millones de casos nuevos al año (11,5 %), y el quinto en letalidad después del cáncer gástrico, con 666.103 casos (6.8%). En Colombia,

concordando con el comportamiento mundial y regional, entre el 2 de enero de 2022 y el 1 de enero de 2023 se notificaron 9.716 nuevos casos de cáncer de mama, de los cuales el 91,67 % correspondieron a formas invasivas, con un predominio del estadio II al momento del diagnóstico (37,51 %). Este tumor representa la principal neoplasia maligna en mujeres en el país y constituye un importante problema de salud pública. (5)

2.2. Patofisiología del cáncer de mama

El cáncer de mama se origina debido a alteraciones en el material genético (ADN) y cambios en los genes, los cuales pueden estar influenciados por la exposición a los estrógenos. En ocasiones, se puede heredar una predisposición genética con defectos en el ADN o genes asociados al cáncer, como BRCA1 y BRCA2. En consecuencia, tener antecedentes familiares de cáncer de mama u ovario aumenta el riesgo de padecer cáncer de mama. En personas sanas, el sistema inmunológico normalmente identifica y ataca las células que presentan anomalías en el ADN o un crecimiento anormal. Sin embargo, este mecanismo de defensa falla en personas con cáncer de mama, lo que favorece el crecimiento y la propagación del tumor.(6)

2.3. Histopatología del cáncer de mama

El cáncer de mama puede ser invasivo o no invasivo según su relación con la membrana basal. Las neoplasias no invasivas de la mama se dividen ampliamente en dos tipos principales, el carcinoma lobulillar in situ (LCIS) y el carcinoma ductal in situ (DCIS).

LCIS es considerado como un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de mama. LCIS se reconoce por su conformidad con el contorno del lóbulo normal, con acinos expandidos y llenos. El DCIS es más heterogéneo desde el punto de vista morfológico que el LCIS, y los patólogos reconocen cuatro tipos amplios de DCIS: papilar, cribiforme, sólido y tipo comedo.

El DCIS se reconoce como espacios discretos llenos de células malignas, por lo general con una capa de células basales reconocible compuesta por células mioepiteliales presumiblemente normales. Los tipos de DCIS papilar y cribiforme son generalmente lesiones de menor grado y pueden tardar más en transformarse en cáncer invasivo.

Los tipos sólido y comedo de DCIS son generalmente lesiones de mayor grado. El DCIS, si no se trata, por lo general se transforma en cáncer invasivo. Los cánceres de mama invasivos se reconocen por su falta de arquitectura general, la infiltración de células al azar en una cantidad variable de estroma o la formación de láminas de células continuas y monótonas sin respeto por la forma y función de un órgano glandular. Los tipos histológicos más frecuentemente diagnosticados en el cáncer de mama invasivo son los ductales y lobulillares.

El cáncer ductal invasivo tiende a crecer como una masa cohesiva; aparece como anomalías discretas en las mamografías y, a menudo, es palpable como un bulto discreto en el seno, siendo generalmente más pequeño que los cánceres lobulillares. El cáncer lobulillar invasivo tiende a penetrar la mama en una sola fila de células discohesivas, lo que explica por qué permanece clínicamente oculto y, a menudo, escapa a la detección en la mamografía o el examen físico hasta que la enfermedad es extensa. El cáncer ductal invasivo, también conocido como carcinoma ductal infiltrante, es la forma más común de cáncer de mama; representa del 50% al 70% de los cánceres de mama invasivos.

El carcinoma lobulillar invasivo representa el 10 % de los cánceres de mama, y los cánceres lobulillares y ductales mixtos se reconocen y describen cada vez más en los informes patológicos. Cuando los carcinomas ductales invasivos adquieren características diferenciadas, se nombran de acuerdo con las características que muestran. Si las células infiltrantes forman pequeñas glándulas revestidas por una sola fila de epitelio con bajo grado nuclear, se denominan carcinoma tubular

infiltrante. Las células infiltrantes pueden secretar grandes cantidades de mucina y parecen flotar en este material. Estas lesiones se denominan tumores mucinosos.

Los tumores tubulares y mucinosos suelen ser lesiones de bajo grado (grado I); estos tumores representan aproximadamente del 2% al 3% de los carcinomas de mama invasivos. El cáncer medular se caracteriza por células invasoras extrañas con características nucleares de alto grado, muchas mitosis y falta de un componente in situ. La malignidad forma láminas de células de forma casi sincitial, rodeadas por un infiltrado de pequeños linfocitos mononucleares. Los bordes del tumor empujan hacia el estroma circundante en lugar de infiltrarse o penetrar el estroma. En su forma pura, el cáncer medular representa solo aproximadamente el 5% de los cánceres de mama.(6)

2.4. Graduación histológica: escala de Nottingham

Se evalúan tres características: formación de túbulos como expresión de diferenciación glandular, pleomorfismo nuclear y recuento mitótico. Se utiliza un sistema de puntuación numérica del 1 al 3 para garantizar que cada factor se evalúe de forma independiente.

Los túbulos y la formación glandular/acinos se evalúan en todo el tumor a bajo aumento; sólo se cuentan las estructuras que exhiben luces centrales claras rodeadas de células neoplásicas polarizadas. Se utilizan puntos de corte del 75 % y el 10 % del área glandular/tumor para determinar la puntuación, con >75% de formación de túbulos/glándulas = puntuación 1, 10–75 % = puntuación 2 y 10 % = puntuación 3.

El pleomorfismo nuclear se evalúa en el área que muestra el mayor grado de pleomorfismo en comparación con la regularidad del tamaño y la forma del núcleo de las células epiteliales normales en el tejido mamario adyacente. La irregularidad creciente de los contornos nucleares y el número y tamaño de los nucléolos son características adicionales útiles para asignar puntajes

para el pleomorfismo. Los núcleos de puntuación 1 son muy similares en tamaño a los núcleos de las células epiteliales benignas preexistentes ($< 1,5$ veces el tamaño) y muestran un pleomorfismo mínimo, un patrón uniforme de cromatina y nucléolos que no son visibles o son muy discretos. Los núcleos de puntuación 2 son más grandes (1,5 a 2 veces el tamaño de los núcleos de células epiteliales benignas), con pleomorfismo de leve a moderado y nucléolos visibles pero pequeños y discretos. Los núcleos de Score 3 son incluso más grandes (> 2 veces el tamaño de los núcleos de células epiteliales benignas), con cromatina vesicular; varían notablemente en tamaño y forma y, a menudo, muestran nucléolos prominentes. El aumento preferido para la puntuación nuclear es el objetivo de 40x.

Se registra el número total de mitosis por 10 campos de alta potencia. Los puntos de corte para la puntuación dependen del tamaño del área del campo, y el microscopio utilizado debe calibrarse midiendo el diámetro del campo de alta potencia (objetivo de 40x). La puntuación se realiza en el área que muestra la frecuencia más alta de figuras mitóticas (método de punto crítico), normalmente el borde de ataque periférico del tumor. Si hay heterogeneidad, se deben elegir las regiones que presenten una mayor frecuencia de mitosis. Una vez que se elige el punto crítico y se considera el primer campo, la selección de campo subsiguiente se realiza de forma aleatoria a través del área elegida, pero solo se deben evaluar los campos con una carga de células tumorales representativa. Se asigna puntaje 1 a siete o menos mitosis, puntaje 2 entre ocho y catorce mitosis, puntaje 3 a quince o más mitosis.

Los tres valores se suman para producir una puntuación de 3 a 9, a la que se asignan grados de la siguiente manera: 3 a 5 puntos = grado 1, bien diferenciado; 6–7 puntos = grado 2, moderadamente diferenciado; y 8-9 puntos = grado 3, pobremente diferenciado. Con el fin de garantizar la calidad, se recomienda informar los componentes de la puntuación individual además

de la calificación calculada. La clasificación de pequeñas muestras de tejido, como las muestras de biopsia con aguja gruesa (CNB), es posible y, a menudo, necesaria en la era del tratamiento neoadyuvante, pero debe reconocerse que tiene limitaciones, en particular debido a la capacidad reducida inherente para evaluar con precisión la frecuencia mitótica. Esto puede dar lugar a una subestimación del grado real en dichas muestras.(7)

2.5. Subtipos moleculares

2.5.1. Subtipo Luminal A

Los tumores de tipo luminal A se distinguen por la presencia de receptores de estrógeno (ER) y/o de progesterona (PR), junto con la ausencia de HER2, y exhiben una baja actividad del marcador de proliferación celular Ki-67 (menos del 20%). En términos clínicos, se caracterizan por ser de bajo grado y crecimiento lento, lo que se traduce en un pronóstico favorable, con menor probabilidad de recurrencia y una mayor tasa de supervivencia. Estos tipos de cáncer responden bien a la terapia hormonal (como el tamoxifeno o inhibidores de la aromataasa), mientras que su respuesta a la quimioterapia es limitada. Por esta razón, las pautas de la Sociedad Europea de Oncología Médica (ESMO) y la Red Nacional Integral del Cáncer de EE. UU. (NCCN) sugieren el uso de pruebas genéticas para identificar qué pacientes podrían beneficiarse de la quimioterapia adyuvante en función del riesgo de recurrencia y la supervivencia. Las recurrencias son más comunes en el hueso, con menos ocurrencias en otros órganos y el sistema nervioso central. Además, la supervivencia después de una recaída suele ser mejor(8).

2.5.2. Subtipo Luminal B

Los tumores luminales B, en contraste, son de mayor grado y tienen un pronóstico menos favorable en comparación con los luminal A. Son ER positivos y pueden ser PR negativos, y tienen una alta expresión de Ki67 (más del 20%). Por lo general, presentan un grado histológico

intermedio o alto y crecen más rápidamente que los luminal A, lo que se traduce en un pronóstico menos favorable. Estos tumores pueden beneficiarse de la terapia hormonal, pero también requieren quimioterapia. La alta expresión de Ki67 indica un crecimiento más rápido y peor pronóstico en comparación con los tumores luminales A. Representan alrededor del 10-20% de los tumores luminales y tienen una expresión moderadamente baja de ER junto con una mayor expresión de genes relacionados con la proliferación celular. Son considerados un subgrupo con un pronóstico menos favorable y requieren un enfoque terapéutico que incluye tanto terapia hormonal como quimioterapia. A pesar de que las recurrencias en los huesos son comunes, las recurrencias en órganos son más frecuentes en este subgrupo en comparación con el grupo anterior(8).

2.5.3. Subtipo HER2

El grupo de cáncer HER2 positivo representa del 10 al 15% de todos los cánceres de mama y se caracteriza por una alta expresión de HER2 junto con la ausencia de ER y PR. Estos tumores tienden a crecer más rápidamente que los luminales y su pronóstico ha mejorado con el desarrollo de terapias dirigidas a HER2. El subtipo HER2 positivo se considera más agresivo y de rápido crecimiento. En este grupo, se pueden identificar dos subtipos: HER2 luminal (ER positivo, PR positivo, HER2 positivo y Ki67: 15-30%) y HER2 enriquecido (HER2 positivo, ER negativo, PR negativo, Ki67: más del 30%). Estos subtipos tienen un pronóstico menos favorable en comparación con los tumores luminales y requieren tratamientos específicos dirigidos a HER2, como trastuzumab, trastuzumab emtansine (T-DM1), pertuzumab e inhibidores de tirosina quinasa como lapatinib y neratinib, además de cirugía y quimioterapia. Tienen una alta tasa de respuesta a la quimioterapia. Las recurrencias en los huesos son comunes, y las recurrencias en órganos también ocurren con más frecuencia en este subgrupo en comparación con el grupo anterior(8).

2.5.4. Subtipo TNBC

El cáncer de mama triple negativo (TNBC) se caracteriza por la ausencia de receptores de estrógeno (ER), progesterona (PR) y HER2. Constituye alrededor del 20% de todos los cánceres de mama. Es más común en mujeres menores de 40 años y en mujeres de ascendencia africana. El subtipo TNBC se puede subdividir en varios grupos adicionales, incluyendo el tipo basal (BL1 y BL2), claudin-low, mesenquimales (MES), receptores de andrógenos luminales (LAR) e inmunomoduladores (IM), siendo los dos primeros los más comunes con un 50-70% y 20-30% de los casos, respectivamente. Cada uno de estos subgrupos presenta características clínicas, fenotipos y sensibilidades farmacológicas distintas. El TNBC tiende a ser agresivo, con una alta probabilidad de recurrencia temprana y una mayor tendencia a diagnosticarse en etapas avanzadas. Se caracteriza por una alta tasa de proliferación, alteraciones en los genes de reparación del ADN y una mayor inestabilidad genómica. Desde un punto de vista histológico, es un tipo de cáncer heterogéneo, altamente proliferativo y poco diferenciado, que abarca subgrupos con pronósticos variados. Desde el punto de vista inmunohistoquímico, se puede subdividir en TNBC basales y no basales, con el primero expresando citoqueratinas (CK) 5/6 y el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano tipo 1 (EGFR1), mientras que los no basales no expresan CK5/6(8).

2.6. Linfocitos infiltrantes de tumores (TILS)

Los linfocitos infiltrantes de tumores (TIL, por sus siglas en inglés) son células mononucleares de origen natural que se infiltran en el microambiente tumoral sólido (TME), que también podría referirse a todas las células inmunitarias en el sitio del tumor(9).

En cáncer de mama, se ha descubierto que los TIL están compuestos principalmente por células T CD4+ y CD8+(10). Las células T CD8+ son generalmente células T citotóxicas capaces de destruir directamente las células cancerosas. En un estudio, el aumento de la presencia de

células T CD8+ evaluado mediante inmunohistoquímica en micromatrices de tejido se relacionó con una mejor supervivencia en los pacientes, independientemente del subtipo de cáncer de mama(11).

Las siguientes son las recomendaciones del Grupo de Trabajo Internacional de TILs 2014 para la evaluación de TILs(1):

1) Los TIL deben informarse para el compartimento del estroma (= % de TIL del estroma). El denominador utilizado para determinar el % de TIL estromales es el área de tejido estromal (es decir, el área ocupada por células inflamatorias mononucleares sobre el área estromal intratumoral total), no el número de células estromales (es decir, la fracción de núcleos estromales totales que representan núcleos de células inflamatorias mononucleares).

2) Los TIL deben evaluarse dentro de los límites del tumor invasivo.

3) Excluir los TIL fuera del borde del tumor y alrededor del CDIS y los lobulillos normales.

4) Excluir TIL en zonas tumorales con artefactos de aplastamiento, necrosis, hialinización regresiva así como en el sitio de biopsia central anterior.

5) Se deben puntuar todas las células mononucleares (incluidos los linfocitos y las células plasmáticas), pero se excluyen los leucocitos polimorfonucleares.

6) Actualmente se considera suficiente una sección (4–5 μm , aumento $\times 200$ –400) por paciente.

7) Siempre que sea posible, se prefieren las secciones completas a las biopsias. Los núcleos se pueden utilizar en el entorno neoadyuvante preterapéutico; actualmente no se ha desarrollado una metodología validada para puntuar los TIL después del tratamiento neoadyuvante.

8) Se debe utilizar una evaluación completa de los TIL promedio en el área del tumor por parte del patólogo. Se recomienda no enfocarse en los puntos críticos.

9) El consenso del grupo de trabajo es que los TIL pueden proporcionar más información biológicamente relevante cuando se puntúan como una variable continua, ya que esto permitirá análisis estadísticos más precisos, que luego se pueden categorizar en torno a diferentes umbrales. Sin embargo, en la práctica diaria, la mayoría de los patólogos rara vez informarán, por ejemplo, un 13,5% y redondearán al 5%-10% más cercano, en este ejemplo, por lo tanto, al 15%. El patólogo debe informar sus puntajes con tanto detalle como él se sienta cómodo.

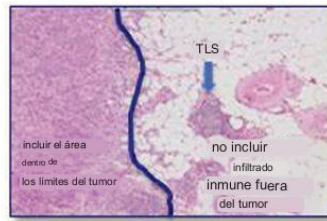
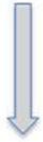
10) Los TIL deben evaluarse como un parámetro continuo. El porcentaje de TIL estromales es un parámetro semicuantitativo para esta evaluación, por ejemplo, 80 % de TIL estromales significa que el 80 % del área estromal muestra un infiltrado mononuclear denso. Para la evaluación de los valores porcentuales, se debe tener en cuenta el patrón de crecimiento disociado de los linfocitos. Los linfocitos típicamente no forman agregados celulares sólidos; por lo tanto, la designación '100% TIL estromales' aún permitiría algún espacio de tejido vacío entre los linfocitos individuales(1).

Los TIL estromales se evaluarán y agruparán en tres categorías: bajo ($< 30\%$), intermedio ($30\% \leq < 75\%$) y alto ($\geq 75\%$). Estos límites se basan de investigaciones previas sobre pacientes no tratados sistémicamente y en un estudio que informa una alta concordancia entre patólogos para los límites del 30% y el 75% (12).

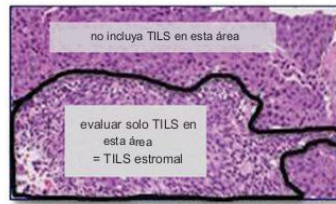
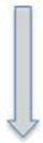
A continuación, se adjuntan recursos gráficos de la aproximación estandarizada para la evaluación de TILs en cáncer de mama:

Figura 1:
Enfoque estandarizado para la evaluación de TIL en cáncer de mama.(1)

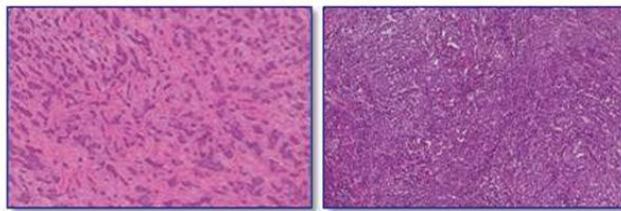
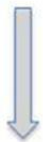
Paso 1: seleccionar el área del tumor



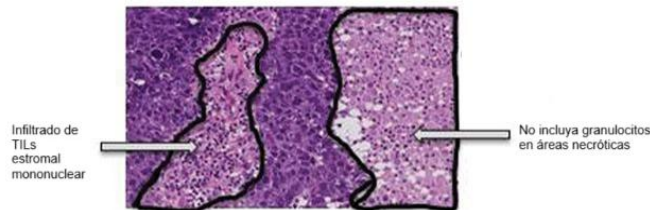
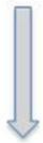
Paso 2: definir el área del estroma



Paso 3: Escanear con poco aumento



Paso 4: determinar el tipo de infiltrado inflamatorio



Paso 5: Evaluar el porcentaje de TILs estromales

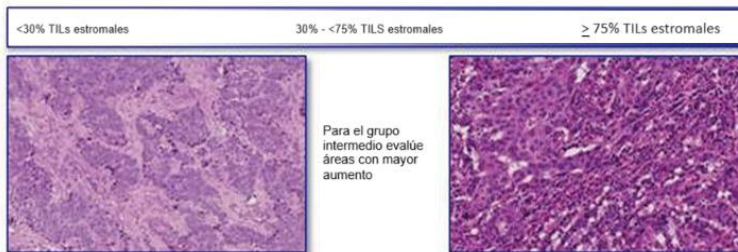
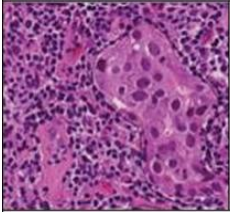
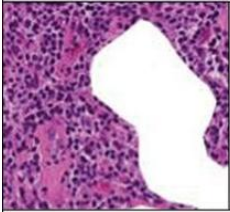
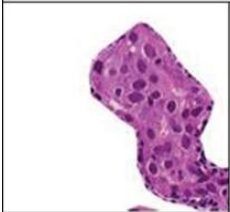
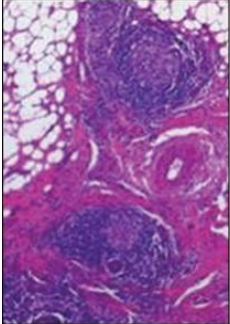


Figura 2:

Morfología, definiciones, relevancia biológica y diagnóstica de los diferentes infiltrados inmunes encontrados en el cáncer de mama.(1)

Morfología	Definición y relevancia biológica	Relevancia Diagnóstica
Cáncer de mama con predominio de linfocitos (LPBC)		
	Categoría de trabajo para describir tumores con "más linfocitos que células de tumor".	Las definiciones varían entre los estudios y se utiliza TILs estromales del 50 al 60 % como umbral. LPBC se puede utilizar para análisis de subgrupos predefinidos y para la descripción de tumores con un infiltrado inmunológico particularmente alto; sin embargo, los TILs son un parámetro continuo y el umbral para LPBC es arbitrario.
TILs Estromales		
	Indicador de aumento de la acumulación de células inmunes en el tejido tumoral	Se ha demostrado que los TILs estromales predicen una mayor respuesta a la quimioterapia neoadyuvante, así como un mejor resultado después de la quimioterapia adyuvante. Este parámetro es el mejor para la caracterización de TILs.
TILs Intratumorales		
	Los TILs en contacto directo entre células y células de carcinoma podrían ser un indicador de efectos antitumorales directos basados en células.	Varios estudios han demostrado que los TILs intratumorales son más difíciles de evaluar y no proporcionan información predictiva/pronóstica adicional en comparación con los TILs estromales.
TILs en el margen invasivo		
Para el cáncer de mama no existen estudios con una evaluación separada de TILs en el borde invasivo.		
Estructuras linfoides terciarias (TLS)		
	Típicamente localizado en el área circundante del tumor, las TLS pueden localizarse en tejido normal directamente adyacente al tumor, que consiste en una zona de células T junto a un folículo de células B, a menudo con centros germinales.	Aún no están optimizadas para evaluaciones no basadas en investigaciones.

3. Pregunta de investigación

¿Cuál es la asociación de los linfocitos infiltrantes tumorales/variables intrínsecas tumorales con la severidad por escala de Nottingham establecida en biopsias y especímenes quirúrgicos de cáncer de mama en un centro referente de patología especializado?

4. Hipótesis de investigación

4.1. Hipótesis nula

No existe asociación entre la presencia de TILs/variables intrínsecas tumorales con severidad por escala de Nottingham establecida en biopsias y especímenes quirúrgicos de cáncer de mama.

4.2. Hipótesis alterna

Existe asociación entre la presencia de TILs/variables intrínsecas tumorales con severidad por escala de Nottingham establecida en biopsias y especímenes quirúrgicos de cáncer de mama.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Determinar la asociación de la expresión de TILs y variables intrínsecas tumorales con la severidad determinada en las diferentes variantes histológicas de cáncer de mama en un grupo de especímenes recogidos entre 2022 y 2023.

5.2. Objetivos específicos

1. Establecer sensibilidad y especificidad de la expresión de los TILs y variables intrínsecas tumorales en las variantes histológicas de alto grado histológico en cáncer de mama.
2. Determinar la prevalencia de la expresión de los TILs y variables intrínsecas tumorales por nivel de severidad en cáncer de mama.
3. Establecer la prevalencia del subtipo molecular Luminal A.
4. Establecer la prevalencia del subtipo molecular Luminal B.
5. Establecer la prevalencia del subtipo molecular HER-2.
6. Establecer la prevalencia del subtipo molecular Triple Negativo
7. Determinar la asociación de TILs y la expresión de subtipos moleculares.

6. Propósito

El propósito de este estudio planteó determinar la prevalencia de los TILs estromales, los subtipos histológicos y el tamaño tumoral en muestras de neoplasia mamaria derivadas del archivo de láminas de un laboratorio de Patología especializado organizadas por edad.

7. Metodología propuesta

7.1. Descripción del tipo del estudio

El presente fue un estudio analítico de una base de datos anonimizada secundaria de muestras en láminas histológicas de patología de pacientes con diagnóstico de cáncer de mama que fueron llevados a mastectomías o cuadrantectomías, procesadas en el laboratorio privado Patología y Diagnóstico Especializado Isabel Bolívar Aguilera S.A.S en el periodo comprendido entre enero de 2022 y diciembre de 2023. Se tomaron como variables independientes las variables intrínsecas tumorales allí descritas. No se requirió información adicional de los pacientes, revisión de historias clínicas ni otros datos distintos a los que reposaban en la base de datos y las muestras.

7.2. Población

7.2.1. Población de referencia

Muestras anatomopatológicas (láminas de biopsias, mastectomías y cuadrantectomías) con diagnóstico establecido de patología tumoral de mama en mujeres mayores de 18 años.

7.2.2. Población blanco

Muestras anatomopatológicas (láminas de biopsias, mastectomías y cuadrantectomías) con diagnóstico de cáncer de mama en mujeres mayores de 18 años de la ciudad de Bucaramanga.

7.2.3. Población de estudio (accesible)

Muestras anatomopatológicas (láminas) con diagnóstico de cáncer de mama en mujeres mayores de 18 años, con estudio histopatológico realizado en el Laboratorio privado Isabel Bolívar.

7.3. Tamaño de la muestra

Para el cálculo del tamaño de la muestra en este estudio de corte transversal se utilizó un software de código abierto para salud pública, OPENEPI versión 3 y se tomaron los resultados del estudio de Denkert et. al. el cual incluyó 3771 pacientes(13): 1677 con TILs bajos y 2094 con TILs intermedios-altos. Se tomó como variable el subtipo molecular Triple Negativo entre los dos grupos obteniendo un O.R. de 0.41 y porcentaje de no expuestos de 71% para el cálculo de la muestra.

Figura 3:
Tamaño muestral

Tamaño muestral: transversal, de cohorte, y ensayo clínico			
Nivel de significación de dos lados(1-alpha)			95
Potencia (1-beta,% probabilidad de detección)			80
Razón de tamaño de la muestra, Expuesto/No Expuesto			1
Porcentaje de No Expuestos positivos			71
Porcentaje de Expuestos positivos			50
Odds Ratio:			0.41
Razón de riesgo/prevalencia			0.71
Diferencia riesgo/prevalencia			-21
	Kelsey	Fleiss	Fleiss con CC
Tamaño de la muestra - Expuestos	86	85	94
Tamaño de la muestra- No expuestos	86	85	94
Tamaño total de la muestra	172	170	188

7.4. Selección de los participantes

7.4.1. Criterios de inclusión

Muestras anatomopatológicas (láminas) con diagnóstico de cáncer de mama en mujeres mayores de 18 años, con estudio histopatológico realizado en el Laboratorio privado Isabel Bolívar.

7.4.2. Criterios de exclusión

- Registro de descripción histopatológica sin lámina de secciones histológicas.
- Muestras anatomopatológicas con registro de antecedente de manejo neoadyuvante.
- Muestras anatomopatológicas con diagnóstico de cáncer de mama in situ, sin componente invasor.

-Muestras anatomopatológicas con diagnóstico de otros tipos de neoplasia diferente a carcinoma en mama.

-Muestras anatomopatológicas con artefactos que impidan una adecuada evaluación de la misma.

7.5. Definición de variables

Tabla 1:

Definición de variables

NOMBRE DE LA VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	ESCALA DE MEDICIÓN
EDAD	Edad confirmada según orden de solicitud de biopsia y base de datos del laboratorio de patología.	Número entero en años.	Cuantitativo o discreto.
LOCALIZACIÓN ANATÓMICA DE LA NEOPLASIA	Región anatómica en donde se localizó la neoplasia (Mama derecha o izquierda, cuadrante o cuadrantes comprometidos).	Localización anatómica donde se reportó la neoplasia en la biopsia o espécimen quirúrgico obtenida durante el procedimiento quirúrgico.	Cualitativa nominal politómica
SUBTIPO HISTOLÓGICO DE CARCINOMA DE MAMA	Clasificación de la variante de carcinoma de mama según las características morfológicas histológicas.	Descripción microscópica y diagnóstico en reporte de biopsia, mastectomía o cuadrantectomía realizado en el laboratorio privado de patología Isabel Bolívar.	Cualitativa nominal, politómica

CARACTERÍSTICAS DE BUENA DIFERENCIACIÓN DE LA LESIÓN NEOPLÁSICA	Puntuación del Score de Nottingham 3 – 5 puntos (Formación de túbulos, tamaño nuclear y conteo mitótico)	Descripción microscópica del reporte de biopsia, mastectomía o cuadrantectomía /Secciones histológicas teñidas con hematoxilina/eosina	Cualitativa ordinal politómica
CARACTERÍSTICAS DE MODERADA DIFERENCIACIÓN DE LA LESIÓN NEOPLÁSICA	Puntuación del Score de Nottingham 6 – 7 puntos (Formación de túbulos, tamaño nuclear y conteo mitótico)	Descripción microscópica del reporte de biopsia, mastectomía o cuadrantectomía /Secciones histológicas teñidas con hematoxilina/eosina	Cualitativa ordinal politómica
CARACTERÍSTICAS DE POBRE DIFERENCIACIÓN DE LA LESIÓN NEOPLÁSICA	Puntuación del Score de Nottingham 8 – 9 puntos (Formación de túbulos, tamaño nuclear y conteo mitótico)	Descripción microscópica del reporte de biopsia, mastectomía o cuadrantectomía /Secciones histológicas teñidas con hematoxilina/eosina	Cualitativa ordinal politómica.
PRESENCIA DE LINFOCITOS INFILTRANTES DE TUMORES (TILs)	Se evaluará 1 sola sección por paciente (4-5 µm, aumento por 200-400)	Descripción porcentual de TILs evaluados en biopsia, mastectomía o cuadrantectomía /secciones histológicas teñidas con hematoxilina/eosina.	Cuantitativa discreta
SUBTIPO MOLECULAR: LUMINAL A	- Receptor de estrógenos + - Receptor de progesterona+ - HER-2 negativo - KI-67 <20%	Descripción microscópica del reporte de biopsia, mastectomía o cuadrantectomía /Secciones histológicas teñidas con panel de inmunohistoquímica para RE (Receptor de estrógenos), RP (Receptor de progesterona), HER-2 y KI-67	Cualitativa nominal, politómica

SUBTIPO MOLECULAR: LUMINAL B	- Receptor de estrógenos + - Receptor de progesterona+/- - HER-2 +/- - KI-67 $\geq 20\%$	Descripción microscópica del reporte de biopsia, mastectomía o cuadrantectomía /Secciones histológicas teñidas con panel de inmunohistoquímica para RE (Receptor de estrógenos), RP (Receptor de progesterona), HER-2 y KI-67	Cualitativa nominal, politómica
SUBTIPO MOLECULAR: HER-2 POSITIVO	- Receptor de estrógenos - - Receptor de progesterona - - HER-2 + - KI-67 $\geq 20\%$	Descripción microscópica del reporte de biopsia, mastectomía o cuadrantectomía /Secciones histológicas teñidas con panel de inmunohistoquímica para RE (Receptor de estrógenos), RP (Receptor de progesterona), HER-2 y KI-67	Cualitativa nominal, politómica
SUBTIPO MOLECULAR: TRIPLE NEGATIVO	- Receptor de estrógenos - - Receptor de progesterona - - HER-2 - - KI-67 $\geq 20\%$	Descripción microscópica del reporte de biopsia, mastectomía o cuadrantectomía /Secciones histológicas teñidas con panel de inmunohistoquímica para RE (Receptor de estrógenos), RP (Receptor de progesterona), HER-2 y KI-67	Cualitativa nominal, politómica
TAMAÑO DE LA NEOPLASIA	Dimensiones del tumor.	Descripción macroscópica del reporte de biopsia, mastectomía o cuadrantectomía, pruebas de imagen reportadas en orden de solicitud.	Cuantitativa continua
EXTENSIÓN A GANGLIOS LINFÁTICOS REGIONALES	Compromiso metastásico de ganglios linfáticos regionales por carcinoma de mama, cualquier variante histológica.	Descripción microscópica del reporte de biopsia, mastectomía o cuadrantectomía/Secciones histológicas teñidas con hematoxilina/eosina	Cuantitativa discreta

METÁSTASIS A DISTANCIA	Compromiso de otros órganos o tejidos distantes a la lesión primaria.	Pruebas de imagen reportadas en formato de solicitud de biopsia, mastectomía o cuadrantectomía y en la base de datos del laboratorio de patología.	Cualitativa nominal dicotómica.
-------------------------------	---	--	---------------------------------

8. Procedimientos para la recolección de la información

Se realizó revisión de la base de registros de biopsias, mastectomías y cuadrantectomías previamente anonimizados, realizadas en el laboratorio de patología especializado dentro del periodo de 2022 a 2023, donde se escogieron los registros con diagnóstico de carcinoma de mama infiltrante, a cuyas laminas se realizó proceso de calidad de la misma y luego se determinó por microscopio óptico las secciones histológicas coloreadas con hematoxilina/eosina, se seleccionaron cuidadosamente las áreas estromales de la lesión tumoral, libres de artefactos de aplastamiento, necrosis, hialinización regresiva, así como sitios de biopsia Tru cut previas y posteriormente se evaluaron los TILs estromales.

8.1. Materiales y métodos

8.1.1. *Evaluación de la calidad de la muestra: láminas rotas, o pérdida de la coloración*

Se utilizaron las láminas de los casos que estaban conservadas adecuadamente, que no estaban rotas o con pérdida marcada de la coloración de histoquímica previa con Hematoxilina-Eosina o tinciones de inmunohistoquímica, recalando que NO se realizaron nuevos cortes sobre los bloques de parafina, no se extrajeron del sitio de custodia (Laboratorio privado Isabel Bolívar) y los datos incluidos en la hoja de cálculo sólo se obtuvieron de la lectura de las láminas existentes, que cumplían con los parámetros de calidad de la muestra implementados por el laboratorio, de la siguiente forma:

8.1.1.1 Recepción, asignación y disección macroscópica. La mayoría, si no todas, las biopsias y las muestras de tejido de gran tamaño se envían al laboratorio de anatomopatología. En circunstancias normales, las muestras se reciben en formol neutro amortiguado al 10 % (con el formol se comienza el proceso de fijación, y se evita la autólisis y la descomposición). La muestra se registra primero en el sistema informático de anatomopatología quirúrgica y se le asigna un número de identificación único, conocido como número de acceso o número de caso. Una vez asignado este número, la muestra se lleva a la sala de disección macroscópica. Dependiendo del sitio de práctica, los residentes, becarios, asistentes de anatomopatología y/o técnicos capacitados son los responsables de la preparación macroscópica de la muestra bajo la supervisión de un anatomopatólogo especialista. En la preparación macroscópica se describen el tamaño, la forma, el color y el aspecto general de la muestra (en ocasiones es necesario realizar un esquema o dibujo del tejido a fines de orientación descriptiva). Después, las muestras de tejido se colocan en casetes de preparación (para las biopsias, la totalidad de la muestra de tejido se coloca en un casete; para muestras de mayor tamaño, se obtienen muestras de tejido de acuerdo con los protocolos establecidos). Cada casete se etiqueta con el número de acceso, así como el designador y el número de pieza. Este esquema de numeración está diseñado para permitir la ubicación de una zona particular de tejido dentro del contexto de la muestra completa.(14)

8.1.1.2. Preparación. Los casetes cargados se almacenan en formol neutro amortiguado al 10 % hasta el tratamiento automatizado de los tejidos. El ciclo de tratamiento normal es de aproximadamente 8 horas, aunque para muestras de tejido pequeñas es usual que el ciclo sea más rápido. El proceso de preparación está diseñado para eliminar agua de la muestra y reemplazarla con parafina. En los procesadores de tejidos automatizados de un sistema cerrado se utilizan técnicas de agitación, de vacío y de aumento de la temperatura para optimizar el proceso. El

proceso es el siguiente: Primero, el tejido se somete a formol neutro amortiguado al 10 % para asegurar una fijación completa, lo que facilita los pasos de deshidratación y previene la contracción del tejido y otros artefactos causados por una deshidratación excesiva o demasiado rápida. Desde el punto de vista químico, el resultado más importante de la fijación con formol es la producción de enlaces cruzados de metileno entre los ácidos nucleicos y/o proteínas, aunque el formol también reacciona con lípidos y carbohidratos. Una vez que el tejido está bien fijado, se somete a varios cambios de alcoholes graduados (se parte de un gradiente de alcohol al 70 % y se termina con alcohol al 100 %). Este proceso permite la eliminación de agua del tejido a una velocidad lenta y controlada. Una vez que el tejido se ha deshidratado completamente, se utiliza un agente aclarante para eliminar el alcohol y permitir la infiltración de tejido con parafina (este agente aclarante debe ser miscible tanto en alcohol como en parafina). El xileno es el compuesto más utilizado para este propósito, aunque hay otros sustitutos disponibles en el mercado. En el siguiente paso, la parafina calentada se infiltra en el tejido(14).

8.1.1.3. Inclusión. Los cortes de tejido correctamente fijados y tratados se incluyen en moldes para prepararlos para la microtomía. El tejido se retira del casete y se orienta en la base de un molde de un tamaño adecuado para que la parafina rodee el corte de tejido. Durante la inclusión, el tejido se orienta con el entendimiento de que la superficie colocada en el molde se convertirá en el frente del bloque de tejido y, por tanto, será la primera superficie que cortará la hoja del micrótopo. Después de la orientación adecuada, el molde y el tejido se acercan a una placa fría para comenzar a solidificar la parafina, de modo que el tejido se mantenga en su lugar mientras el molde se llena con parafina. El casete vacío se coloca encima del molde de modo que pasa a ser la parte posterior del bloque de tejido (debe conservarse eficazmente la identificación de esa muestra

de tejido). Finalmente, el molde se deja enfriar para que el bloque de parafina que contiene el tejido orientado pueda retirarse fácilmente(14).

8.1.1.4. Microtomía. El instrumento de micrótopo está diseñado para mantener firmemente el bloque de parafina en su sitio mientras se enfrenta cíclicamente a una hoja de micrótopo estacionaria. Con cada vuelta del mango del micrótopo (cada ciclo), el bloque de tejido se avanza a una distancia establecida. La mayoría de los tejidos se cortan con un grosor de 4 μm a 5 μm . Sin embargo, algunos tejidos más son finos (3 μm ; p. ej., biopsias de riñón y de ganglios [nódulos] linfáticos) y otros más gruesos (5 a 6 μm ; p. ej., hueso y cerebro)(14).

En la práctica, el bloque de parafina primero se coloca «de frente» para alcanzar un nivel de tejido con un plano de corte representativo. Luego, el bloque se enfría en hielo húmedo para endurecer aún más la parafina y facilitar la microtomía. Los cortes individuales se desprenden de la hoja del micrótopo conectados entre sí, formando así una cadena de cortes de tejido denominados «cinta». Posteriormente, esta cinta de tejido se hace flotar en un baño de agua tibia a una temperatura de 6° C a 8° C por debajo del punto de fusión de la parafina, de manera que se torna muy flexible. Esto ayuda a ensamblar los cortes en un portaobjetos de vidrio etiquetado con el número de acceso correspondiente y el identificador de la pieza para ese bloque en particular(14).

8.1.1.5. Tinción con hematoxilina y eosina. Los cortes se tiñen para que revelen los detalles histológicos. La tinción principal utilizada para el diagnóstico anatomopatológico es la tinción con hematoxilina y eosina (H&E). La hematoxilina se deriva del árbol *Corymbia opaca* y se utiliza desde hace años en el laboratorio de anatomopatología. Por sí sola no es un tinte, pero, una vez que se oxida a hemateína y se combina con un mordiente metálico, adquiere una afinidad significativa por la cromatina nuclear. La eosina es un colorante que, a un pH de aproximadamente

4.6 a 5, es un anión fuerte y, por tanto, tiene afinidad por grupos de proteínas tisulares catiónicas con carga positiva. Con el pH adecuado, la eosina se combina en diferentes proporciones con las proteínas tisulares y, por tanto, produce una graduación de distintos tonos de rosa claro a rojo rosado(14).

Las dos variaciones generales de la tinción con H&E de uso común son los métodos progresivos y los métodos regresivos. En los métodos progresivos, las preparaciones se tiñen durante un periodo designado, proceso que se detiene tan pronto como se haya alcanzado la tinción óptima; cada tejido se tiñe de forma ligeramente diferente con hematoxilina en función del tipo, la fijación y descalcificación previos. En los métodos regresivos los cortes de tejido se tiñen primero con hematoxilina, y luego se diferencia la hematoxilina usando alcohol ácido. Con la sobretinción y posterior diferenciación de la hematoxilina con el método regresivo permite obtener una tinción más oscura y nítida(14).

El protocolo rutinario de tinción regresiva para la tinción con hematoxilina y eosina es el siguiente. Los cortes de tejido se secan completamente en un horno, ya que el agua que queda sobre o debajo de los cortes puede hacer que se caigan del portaobjetos durante el proceso de tinción. Luego, se retira la parafina de las preparaciones sumergiéndolas en xileno, este último se elimina con alcohol y, después, se rehidratan las preparaciones con alcohol al 95 % y con agua antes de teñirlas con hematoxilina. A continuación, se elimina el exceso de hematoxilina con un enjuague con agua, las preparaciones se diferencian con alcohol ácido, así como se enjuagan, y la hematoxilina se torna «azulada» con la inmersión en una solución acuosa de amoníaco débil. Las preparaciones se enjuagan nuevamente, se colocan en alcohol al 80 % y se tiñen con eosina. El exceso de eosina se elimina mediante enjuagues con alcohol y, finalmente, se prepara el

portaobjetos con un cubreobjetos y un medio de resina por medio de la eliminación del alcohol con enjuagues con xileno(14).

8.1.1.6. Inmunohistoquímica. La inmunohistoquímica es una técnica auxiliar ampliamente empleada en el campo de la patología quirúrgica anatómica para identificar y diagnosticar células. Esta técnica se basa en el uso de anticuerpos específicos dirigidos contra ciertos antígenos presentes en tejidos y células, lo que facilita la identificación del tipo de célula y el órgano de origen. Por lo general, se realiza en tejido fijado con formalina e incluido en parafina (FFPE) debido a su facilidad de almacenamiento(15).

En esta técnica, se utiliza un anticuerpo primario, que puede ser monoclonal o policlonal, y se ajusta su concentración para lograr un contraste óptimo entre el tejido teñido positivamente y la tinción de fondo no específica. Los anticuerpos monoclonales, que se dirigen a un solo epítipo, tienden a ser más específicos, mientras que los anticuerpos policlonales, que pueden unirse a varios epítipos diferentes, suelen ser más sensibles. Generalmente, se comienza con la dilución recomendada por el fabricante o la literatura científica para el tejido de interés y se prueban diluciones más concentradas y menos concentradas para determinar la mejor dilución. Además, se pueden combinar diferentes diluciones del anticuerpo secundario junto con métodos específicos de amplificación y cromógenos para lograr una tinción óptima. La concentración de anticuerpos recomendada para la titulación inicial suele ser de 1 a 5 $\mu\text{g/ml}$ (15).

Para visualizar la interacción antígeno-anticuerpo bajo el microscopio, se marcan tanto el anticuerpo primario como el secundario, que se dirige a la inmunoglobulina de la especie de origen del anticuerpo primario. Hay dos métodos para marcarlos: el directo y el indirecto. El método directo implica marcar el anticuerpo primario y aplicarlo al tejido en un solo paso, pero rara vez se usa debido a la falta de amplificación de la señal, lo que requiere una concentración más alta de

anticuerpo. El método indirecto implica marcar el anticuerpo secundario, permitiendo la amplificación de la señal y su uso con múltiples anticuerpos primarios. Se utilizan diversas moléculas marcadoras, como fluorescentes o enzimas como la peroxidasa de rábano picante o la fosfatasa alcalina, que producen una señal coloreada tras la incubación con un sustrato cromogénico, como la diaminobencidina (DAB)(15).

El control de calidad es esencial en este proceso, y se deben realizar controles positivos y negativos en cada ejecución. Los controles positivos son tejidos que se sabe que reaccionan con un anticuerpo específico y se procesan idealmente junto con el tejido de interés para asegurar condiciones de reacción similares. Los controles negativos implican muestras de tejido sometidas a las mismas condiciones de tinción, pero sin el anticuerpo primario o con una inmunoglobulina no inmune de la misma especie, para evitar la unión de anticuerpos inespecíficos(15).

8.1.2. Interpretación de la evaluación de los TILs

Se llevó a cabo según lo expuesto en la sección 2 Marco Teórico, subíndice 2.6 Linfocitos infiltrantes de tumores (TILs).

La competencia en lectura de TILs se ha adquirido siguiendo el entrenamiento pertinente que realiza el International Immuno-Oncology Biomarker Working Group on Breast Cancer, a través del link <https://virtuelle-mikroskopie.de/TIL-training>.

8.2. Análisis estadístico

8.2.1 Análisis univariado

Se evaluaron las variables recolectadas según su nivel de medición (medias o medianas para las variables continuas, proporciones para las categóricas o nominales), se reportaron los respectivos intervalos de confianza del 95%. La comparación entre los grupos se hizo a través de Mann Whitney o Ttest con sus respectivos valores de p para las variables cuantitativas y χ^2 y Fisher

para las cualitativas considerando diferencias significativas con una p menor de 0.05 previa verificación de normalidad. Su cálculo permitió definir el uso de pruebas no paramétricas en la comparación de grupos, en caso de variables de distribución no normal. Además, se escogió el test de Spearman para la realización de los análisis de correlación.

8.2.2 Análisis bivariado

Se evaluó la asociación entre el desenlace (la severidad por escala de Nottingham) y cada una de las variables independientes empleando regresión logística. Se realizó el cálculo de medidas de efecto como el Odds Ratio (OR) para todas las variables de interés con sus respectivos IC-95%, y se escogieron las que mostraban una mayor asociación definida por un valor de $p < 0.20$. Las diferentes variables de exposición que presentaron este criterio fueron posteriormente dicotomizadas de acuerdo a los valores descritos en la literatura. Se realizó una matriz de correlación de Spearman con el fin de evaluar colinealidad entre las variables anteriormente escogidas teniendo como punto de corte para colinealidad un coeficiente de correlación > 0.3 .

8.2.3 Análisis multivariado

Se realizó un análisis de regresión logística multivariado, para predecir la ocurrencia de cáncer de mama de alto grado histológico a partir de las variables que pudiesen estar potencialmente asociadas con su ocurrencia.

La inclusión de las variables independientes seleccionadas por el análisis bivariado, con un nivel de significancia de $p < 0.20$, se hizo siguiendo la metodología de STEPWISE, según el resultado de análisis de colinealidad y se incluyeron las variables género y edad debido a su significancia clínica con el desenlace.

Se corrió el modelo completo y mediante la técnica BACKWARD se fueron retirando una a una según su falta de significancia estadística ($p > 0.05$), se dejaron al final aquellas que mantuvieron esa significancia.

Se realizó la bondad de ajuste del modelo y se evaluó el desempeño evidenciando su capacidad discriminativa a través de la sensibilidad y especificidad del mismo y del estadístico C.

9. Consideraciones éticas

Este se clasificó como un estudio “sin riesgo” de acuerdo con el literal “A” del artículo 11 de la Resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia y la Declaración de Helsinki, ya que no se realizó ninguna intervención o modificación intencionada de las variables biológicas, fisiológicas, psicológicas o sociales de los individuos. Así mismo, fue amparada por el parágrafo primero del artículo 16 de la resolución 8430 de 1993 para dispensar al investigador de la obtención de consentimiento informado.

Debido a que se incluyeron datos sensibles según el Artículo 5 de la Ley 1581 del 2012, se trabajó con la base de datos anonimizada entregada por el Laboratorio privado Isabel Bolívar, para estudios médico-científicos sin posibilidad de identificación.

El presente trabajo de investigación se rigió por los principios éticos de:

Principio de respeto: Este principio se cumplió utilizando una codificación especial de la muestra de tejido, por lo que se empleó de manera anónima y se respetó así la identidad de los pacientes. Además, fuimos prudentes en la socialización del impacto del resultado de las pruebas y su real aplicación.

Principio de beneficencia: Los investigadores protegimos y resguardamos las láminas de Hematoxilina-Eosina e inmunohistoquímica anonimizando los datos personales asociados a los mismos. Además, también se cumplió este principio al omitir las evaluaciones sobre las láminas de Hematoxilina-Eosina e inmunohistoquímica que no poseían adecuada validación que pudieran llevar a dar conclusiones incorrectas que generaran daño sobre los pacientes.

Principio de no maleficencia: La presente investigación no confirió riesgo adicional, dado que no se realizó ninguna intervención sobre los pacientes implicados, debido a que solo se trabajó con láminas de Hematoxilina-Eosina e inmunohistoquímica entregadas por el Laboratorio privado Isabel Bolívar.

Principio de justicia: En cumplimiento a este principio, se desarrollaron métodos que permitieron garantizar una adecuada lectura e interpretación de los hallazgos histopatológicos, de las muestras que fueron susceptibles de estudio. La codificación especial se mantuvo y se garantizó así la anonimidad de los pacientes.

Principio de autonomía: Se respetó el derecho de autonomía al mantener la anonimidad de los datos personales relacionados previamente con las láminas de Hematoxilina-Eosina e inmunohistoquímica.

Principio de respeto: Se estableció el principio de respeto, ya que fuimos prudentes en la socialización del impacto del resultado de la lectura e interpretación de los hallazgos histopatológicos.

9.1. Proceso para la información

Se efectuó primero la presentación de la propuesta de investigación ante el comité de Ética en Investigación Científica de la Universidad Industrial de Santander, y una vez aprobado por parte del Comité, se presentó al laboratorio privado Patología y Diagnóstico Especializado Isabel

Bolívar Aguilera S.A.S y con ello se solicitó permiso para acceder a la información que se requirió para la ejecución del proyecto. Con la aprobación se procedió a:

1. Se revisaron los casos del sistema de archivo del Laboratorio privado Isabel Bolívar, que cumplían con los criterios de selección para ingreso: Que correspondieran a muestras de mama, y que dentro de la solicitud del estudio histopatológico contuvieran los datos clínicos requeridos, se utilizó el consecutivo de la solicitud del estudio histopatológico (se garantizó la anonimidad de los pacientes), posteriormente se verificó en las bases de datos del laboratorio que el diagnóstico de las muestras fuera el de adenocarcinoma de mama invasor.

2. A continuación se efectuó la consignación de los datos según el instrumento de recolección de las variables (ver anexo 1).

3. La base de datos se diligenció en un archivo en formato Excel, para su análisis e interpretación estadística.

4. Se revisó el archivo de láminas con tinción de hematoxilina y eosina e inmunohistoquímica, de los casos que fueron seleccionados y se procedió a la lectura de las láminas en el microscopio de luz.

10. Tratamiento de datos personales

Se respetaron los principios para el tratamiento de datos personales que consigna el artículo 4 de la misma ley, dado que solo se trabajó con la base de datos y las muestras (láminas) anonimizadas entregadas por el Laboratorio privado Isabel Bolívar, quienes salvaguardaron los datos personales.

En relación con el Artículo 5 de la Ley 1581 del 2012, se utilizaron solo los datos sensibles entregados por el Laboratorio privado Isabel Bolívar y que tuvieran relación con las variables previamente aceptadas.

El tratamiento de estos datos sociodemográficos, clínicos y hallazgos microscópicos solo tuvo finalidades estadísticas, académicas y científicas dado la supresión de la identidad de los sujetos (titulares).

La información que se obtuvo dentro de la investigación se guardó en hojas de cálculo que fueron salvaguardadas por el Director de proyecto de investigación, Dr. Ernesto García Ayala (empleado de planta de la UIS), en el disco duro del computador de mesa institucional con número de inventario interno de la UIS 136940, que se encontraba en su oficina, además, estas hojas de cálculo fueron protegidas por contraseña, de la cual solo tuvieron conocimiento el Investigador principal y el Director de proyecto de investigación. Se garantizó su protección por un periodo de 3 años, posterior al cual se procedió con su destrucción.

11. Resultados

11.1 Análisis univariado

En el análisis univariado de los 198 casos incluidos en el estudio, la mayoría de las muestras correspondieron a biopsias trucut (83,8%, n=166), seguidas de cuadrantectomías y mastectomías (Ver tabla 2, figura 4). La edad promedio de las pacientes fue de $61,1 \pm 12,9$ años, con un rango entre 25 y 87 años. (Ver tabla 3, figura 5).

En cuanto a la localización tumoral, el cuadrante superior externo fue el más afectado, seguido por el cuadrante superior interno, mientras que los cuadrantes inferiores y la región central

se presentaron con menor frecuencia (Ver tabla 4, figura 6). Respecto al subtipo histológico, predominó el carcinoma ductal invasor sin tipo especial, con una menor proporción de carcinomas lobulillares y otras variantes (Ver tabla 5, figura 7).

La distribución de los subtipos moleculares mostró que el Luminal A fue el más frecuente (45,2%, n=89), seguido de Luminal B (38,6%, n=76), triple negativo (10,2%, n=20) y HER2-enriquecido (6,1%, n=12) (Ver tabla 6, figura 8). En relación con el grado histológico Nottingham, predominó el grado intermedio (6–7 puntos), seguido del grado bajo (3–5 puntos) y el grado alto (8–9 puntos) (Ver tabla 7, figura 9).

El índice proliferativo Ki-67 presentó una media de $25,3 \pm 19,1\%$, con valores $>40\%$ en el 14,7%(n=29) de los casos (Ver tabla 8, figura 10). La infiltración linfocitaria tumoral (TILs) mostró una prevalencia del 13,5%(n=22) para niveles intermedios-altos, mientras que el grupo con TILs bajos ($<30\%$) fue el más frecuente (86,5%, n=141)(Ver tabla 9, figura 11).

En cuanto a los biomarcadores, el 85,6%(n=170) de los tumores fueron positivos para receptores de estrógenos, el 73,2%(n=145) para receptores de progesterona, y el 6,1%(n=12) fueron clasificados como HER2-enriquecidos (Ver tabla 10, figura 12).

La invasión linfovascular se observó en el 8,6%(n=17) de los casos, y la invasión perineural en un porcentaje menor (7,07%, n=14) (Ver tabla 11, figura 13; tabla 12, figura 14).

Se identificó compromiso ganglionar regional en un total de 12 de las 30 pacientes que contaban con vaciamiento, lo que representa una frecuencia de 40,0%. Al separar los datos según el número de ganglios linfáticos positivos, 9 casos (30,0%) presentaron metástasis en 1 a 3 ganglios, representando el grupo más frecuente dentro de las pacientes con compromiso ganglionar. 3 casos (10,0%) evidenciaron metástasis en 4 a 9 ganglios linfáticos. (Ver tabla 13, figura 15).

En cuanto al tamaño tumoral, de los 198 casos de cáncer de mama incluidos en este estudio, se contó con datos completos de tamaño tumoral en 180 pacientes (90,9%), mientras que 18 casos (9,1%) no tenían este dato disponible al momento del análisis. Los resultados indican que, en promedio, los tumores presentaron un tamaño cercano a 3 cm, con una considerable variabilidad (hasta 11 cm como valor máximo) (Ver tabla 14, figura 16).

Estos hallazgos descriptivos proporcionan el contexto clínico-patológico de la cohorte estudiada y constituyen la base para los análisis bivariados y multivariados desarrollados posteriormente.

Tabla 2:

Tipo de muestra

Tipo de Muestra	Frecuencia	%
1: TruCut	166	83,8
2: Cuadrantectomía	23	11,6
3: Mastectomía	8	4

Figura 4:

Tipo de muestra

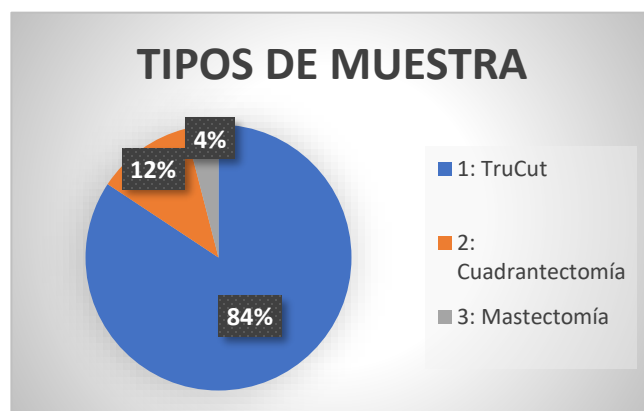


Tabla 3:*Edad*

Estadístico	Valor
N válido	198
Mínimo (años)	24
Máximo (años)	95
Media (años)	60,76
Desv. Est.	12,96
N sin datos	0
Total	198

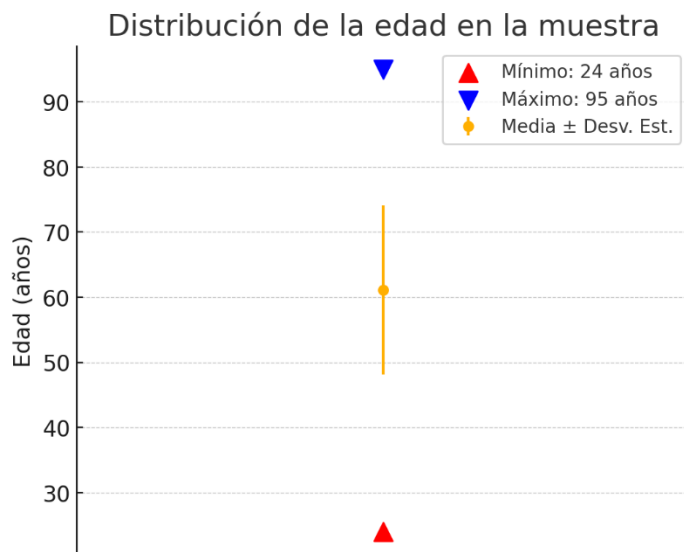
Figura 5:*Edad*

Tabla 4:*Localización*

Localización	Frecuencia	Porcentaje
Mama derecha	99	50,25
Mama izquierda	98	49,75
Cuadrante superior externo	75	37,88
Cuadrante inferior externo	38	19,19
Cuadrante superior interno	58	29,29
Cuadrante inferior interno	36	18,18
Cuadrante central	10	5,05

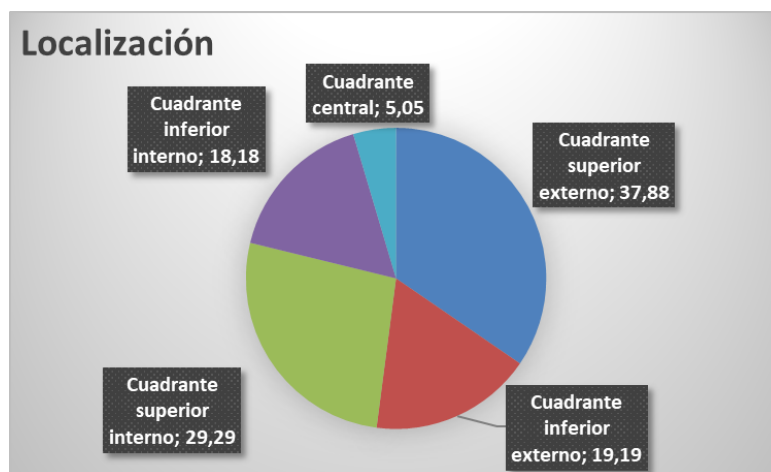
Figura 6:*Localización*

Tabla 5:*Subtipo histológico*

Subtipo histológico	Frecuencia	Porcentaje
Ductal sin tipo especial	169	85,35
Microinvasivo	1	0,51
Lobulillar	14	7,07
Tubular	0	0
Cribiforme	0	0
Mucinoso	9	4,55
Cistadenocarc. Muc.	0	0
Micropapilar	4	2,02
Dif.apocrina	0	0
Metaplásico	2	1,01

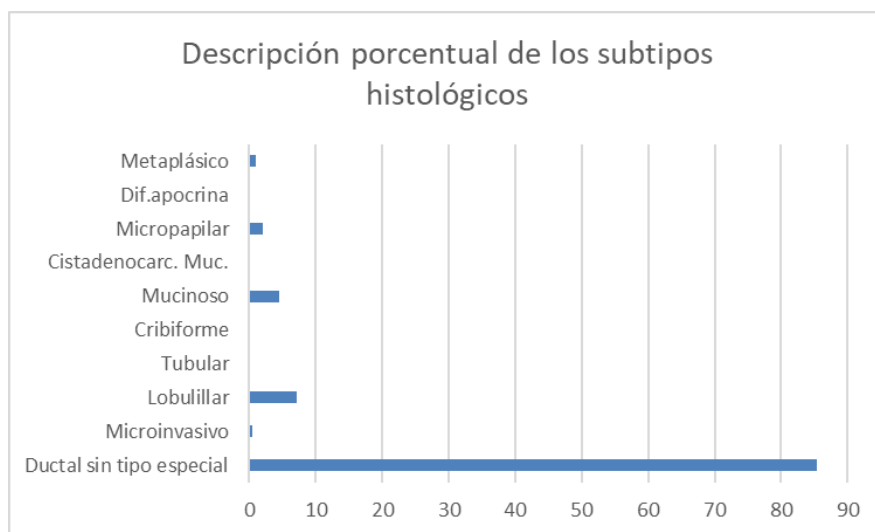
Figura 7:*Subtipo histológico*

Tabla 6:*Subtipos moleculares*

Subtipo Molecular	Frecuencia	Porcentaje
Luminal A	89	44,94
Luminal B	76	38,38
Triple negativo	20	10,1
HER-2 enriquecido	12	6,06
No especificado	1	0,5

Figura 8:*Subtipos moleculares*

Distribución porcentual de los Subtipos Moleculares

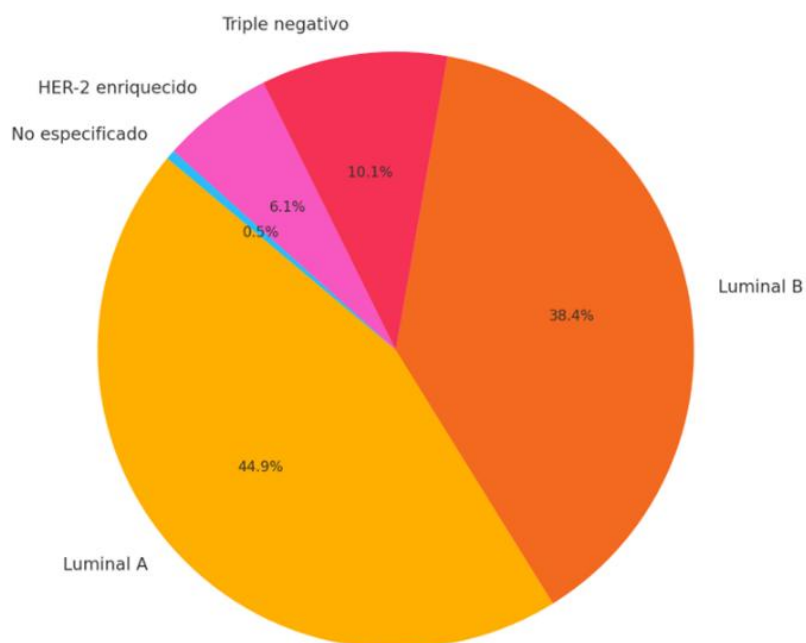


Tabla 7:*Grado de Nottingham*

Grado de Nottingham	Frecuencia	Porcentaje
Grado 1 (3-5)	40	20,2
Grado 2 (6-7)	111	56,06
Grado 3 (8-9)	47	23,74
Total	198	100

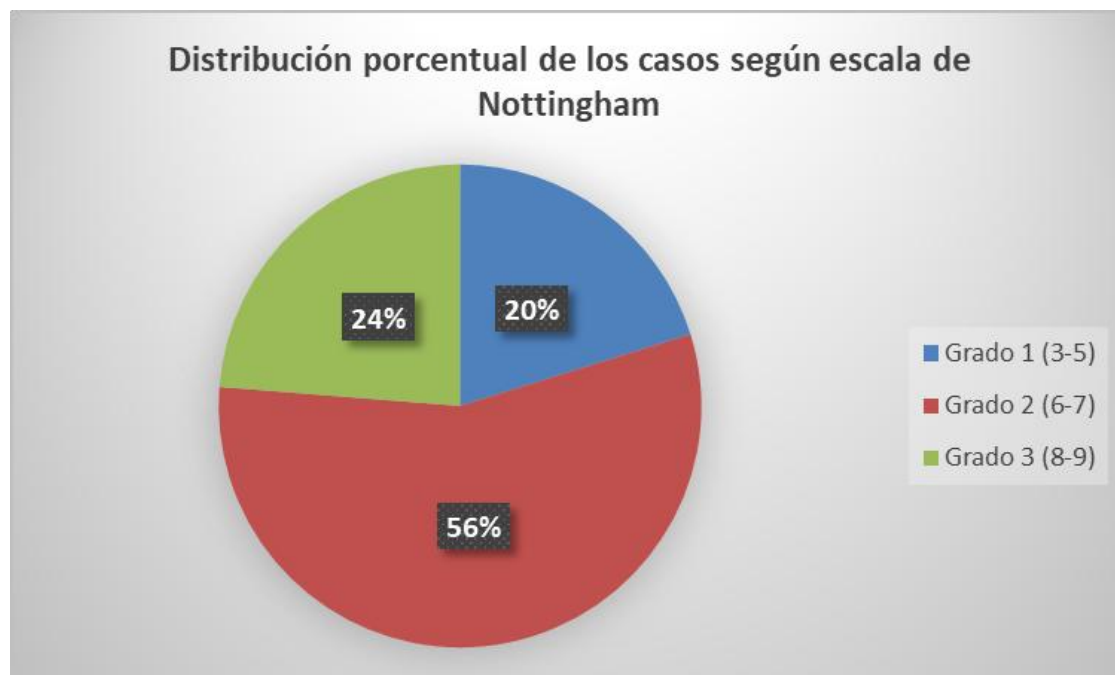
Figura 9:*Grado de Nottingham*

Tabla 8:*KI-67*

	Categoría	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa
1	KI-67 menor o igual a 40%	169	83,35%
2	KI-67 mayor de 40%	29	14,65%

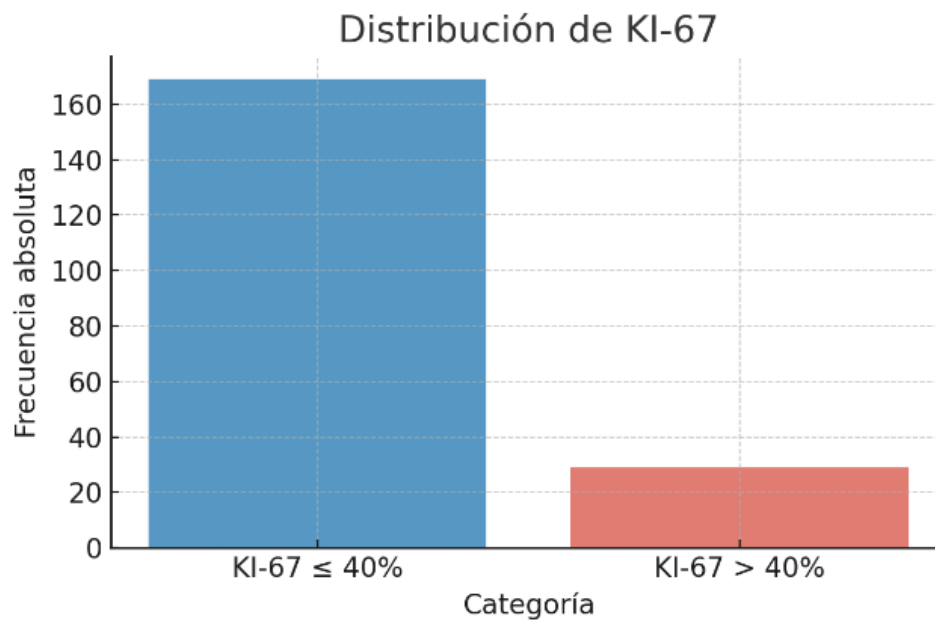
Figura 10:*KI-67*

Tabla 9:*TILs*

Categoría de TILs	Frecuencia	Porcentaje
Bajos (<30%)	141	71,21
Intermedios (30%-<75%)	12	6,06
Altos (\geq75%)	10	5,05

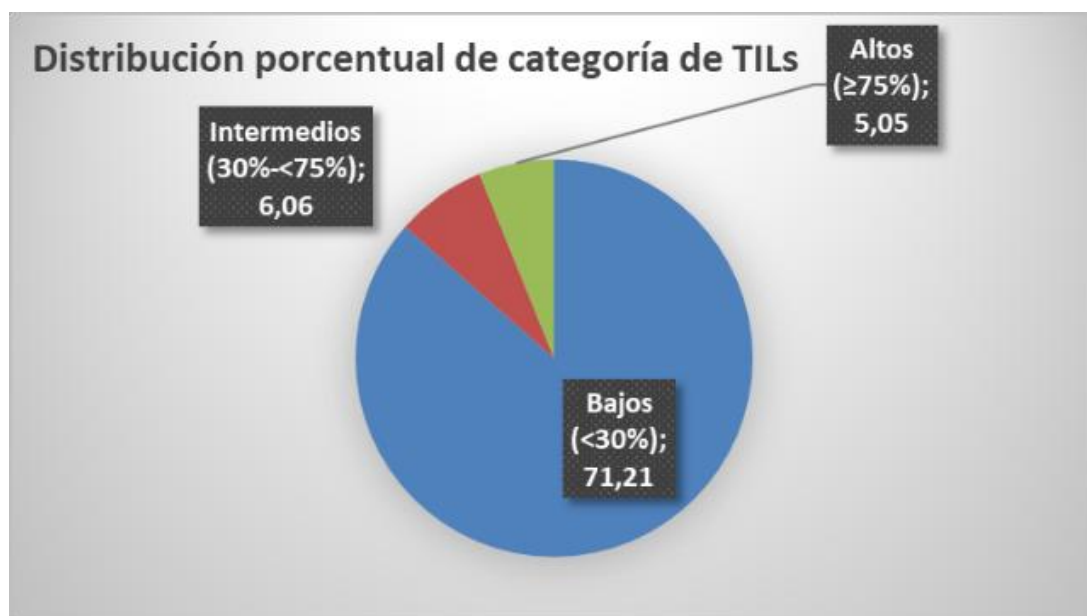
Figura 11:*TILs*

Tabla 10:*Receptores hormonales y HER-2*

Marcador	Frecuencia Positivos	Frecuencia Negativos	Porcentaje Positivos
Estrógenos (ER)	170	27	85,86
Progesterona (PR)	145	53	73,23
HER2 (3+)	12	186	6,06

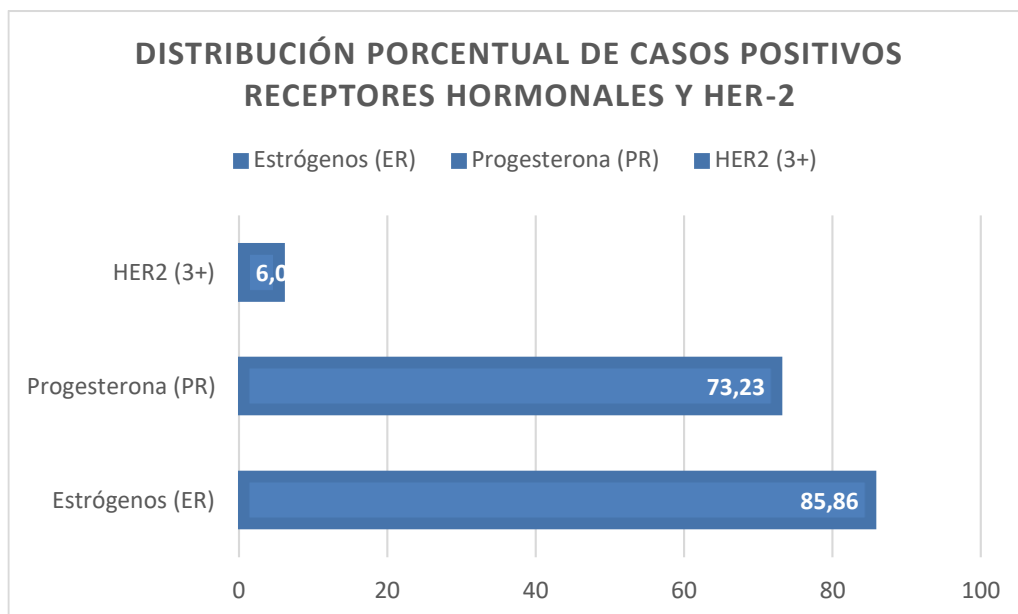
Figura 12:*Receptores hormonales y HER-2*

Tabla 11:*Invasión linfovascular*

Característica	Presente	Ausente
Linfovascular	19	179
% Total	9,60%	90,40%

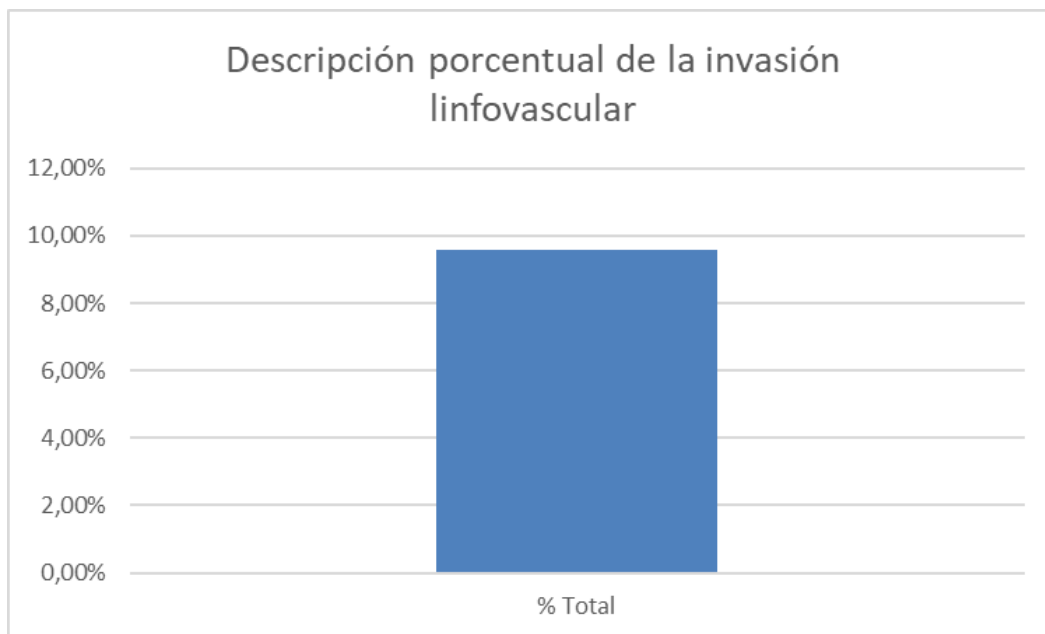
Figura 13:*Invasión linfovascular*

Tabla 12:*Invasión perineural*

Característica	Presente	Ausente
Perineural	14	184
% Total	7,07%	92,93%

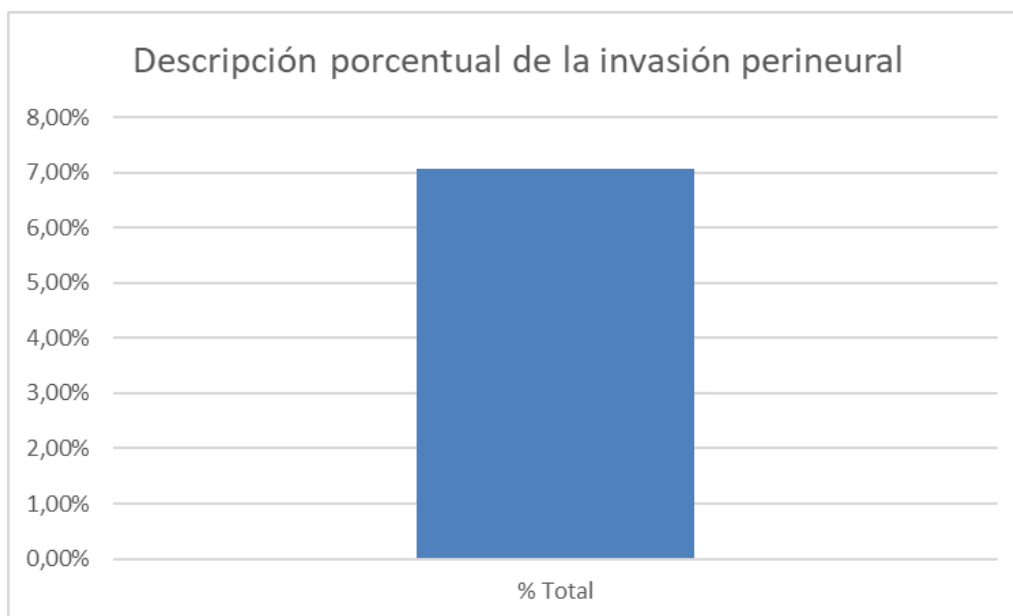
Figura 14:*Invasión perineural*

Tabla 13:*Ganglios*

Ganglios linfáticos positivos	Frecuencia	Porcentaje
1-3	9	30 %
4-9	3	10 %

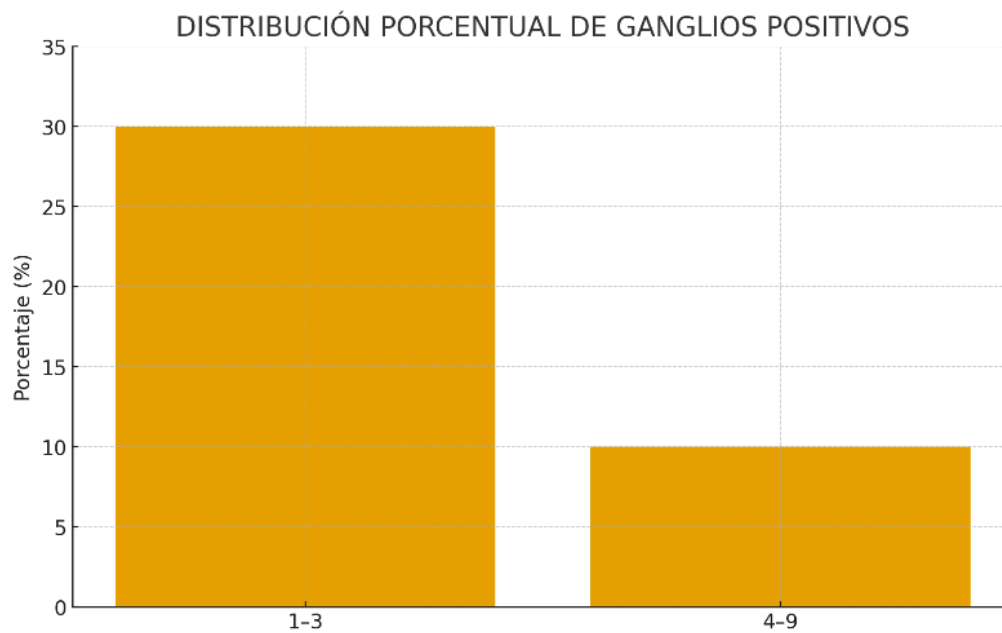
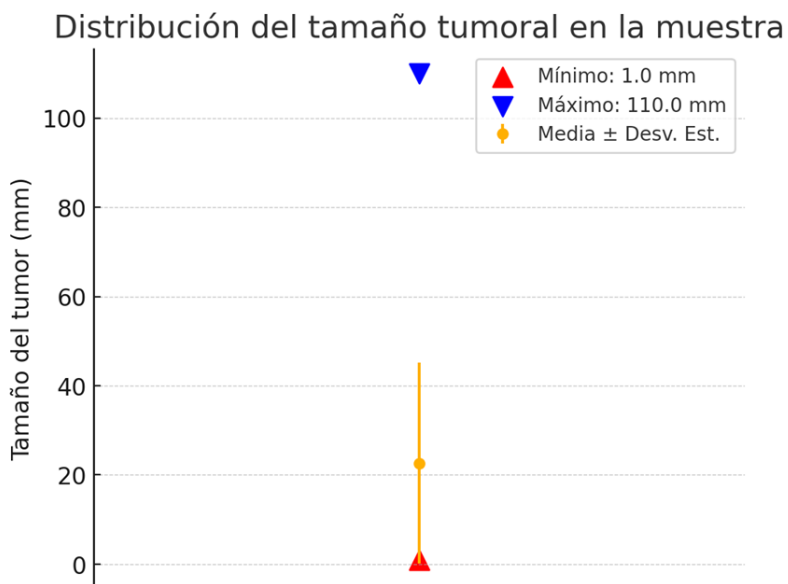
Figura 15:*Ganglios*

Tabla 14:*Tamaño tumoral*

Estadístico	Valor
N válido	180
Min (mm)	1
Max (mm)	110
Media (mm)	29,8
Desv. Est.	14,2
N sin datos	18
Total	198

Figura 16:*Tamaño tumoral*

11.2 Análisis bivariado

En el análisis bivariado se identificaron asociaciones significativas entre los niveles de linfocitos infiltrantes de tumor (TILs), el grado histológico de Nottingham y diversas variables clínicas, histopatológicas y moleculares.

Los tumores de alto grado (Nottingham 8–9 puntos) presentaron una probabilidad 9,18 veces mayor de mostrar TILs intermedios-altos (IC95%: 2,24–37,56; $p < 0,001$) (Ver tabla 15, figura 17).

A su vez, el subtipo triple negativo mostró una probabilidad 13 veces mayor de presentar TILs intermedios-altos (IC95%: 4,20–41,13; $p < 0,001$), mientras que el subtipo luminal A se asoció con una reducción del 91% en la probabilidad de TILs elevados (OR=0,091; IC95%: 0,0206–0,4076; $p < 0,001$) (Ver tabla 15, figura 18).

En cuanto al índice Ki-67, cada aumento del 1% se asoció con un incremento del 4% en la probabilidad de TILs intermedios-altos (OR=1,04; IC95%: 1,0258–1,0732; $p < 0,001$). Además, los tumores con Ki-67 >40% tuvieron una probabilidad 6,28 veces mayor de presentar TILs intermedios-altos (IC95%: 2,28–17,30; $p < 0,001$) (Ver tabla 15, figura 19).

La positividad a receptores de estrógenos (RE) se asoció con menor probabilidad de presentar TILs intermedios-altos (OR=0,28; IC95%: 0,099–0,844; $p = 0,02$), mientras que la positividad a receptores de progesterona (RP) mostró una tendencia protectora no estadísticamente significativa (OR=0,46; $p = 0,11$) (Ver tabla 15, figura 20). Las pacientes con 55 años o menos tuvieron 2,82 veces más probabilidad de presentar niveles intermedios-altos de linfocitos infiltrantes de tumor (TILs), en comparación con las pacientes mayores de 55 años (OR=2,82; IC95%: 1,13–7,05; $p = 0,02$) (Ver tabla 15, figura 21).

Entre los niveles de linfocitos infiltrantes de tumor (TILs) y las variables de invasión linfovascular, perineural y ganglionar, no se evidenciaron asociaciones estadísticamente significativas. Los odds ratios obtenidos para cada categoría de TILs estuvieron cercanos a la unidad, con valores de p superiores a 0,90 en la mayoría de los casos y amplios intervalos de confianza, lo cual refleja una posible ausencia de relación clínicamente relevante y sugiere baja potencia estadística o limitaciones en el tamaño muestral (Ver tabla 16).

Respecto a la invasión linfovascular, se identificó una asociación significativa con la localización tumoral en el cuadrante inferior externo ($OR=5,01$; $p=0,01$) y en el cuadrante central ($OR=8,14$; $p=0,01$), ambas con mayor riesgo de invasión (Ver tabla 17, figura 22). Además, la positividad a RE se relacionó con una menor probabilidad de invasión linfovascular ($OR=0,28$; $IC95\%: 0,099-0,844$; $p=0,02$), mientras que la RP no mostró asociación significativa (Ver tabla 17, figura 23). También se evidenció una asociación significativa entre la invasión linfovascular y el grado histológico de Nottingham, siendo más frecuente en tumores de alto grado (8–9 puntos) ($OR=3,22$; $IC95\%=1,1507-9,0224$; $p=0,02$). Este hallazgo sugiere que los tumores de mayor grado histológico tienen un riesgo 3 veces mayor de presentar invasión linfovascular en comparación con tumores de menor grado (Ver tabla 17, figura 24).

Por otro lado, la edad menor o igual a 45 años se asoció con una probabilidad 3,49 veces mayor de presentar grado Nottingham severo ($IC95\%: 1,15-10,59$; $p=0,03$), y la positividad al receptor de progesterona actuó como un factor protector, con $OR=0,22$ ($IC95\%: 0,09-0,52$; $p=0,001$) (Ver tabla 18).

Tabla 15:*Análisis bivariado entre linfocitos infiltrantes de tumores y demás variables*

	N	ME AN/ SD	%	TILs INTE RM- ALTO ++	TILs INTE RM- ALTO --	P	C O EF C O R R	P	O R	P	IC9 5%
TIPO DE MUESTRA	198										
EDAD	198	61,11 /12,96		22/55/ 14,49	141/62, 19/55	0, 0	- 0,1	0, 0	0, 0	0, 0	0.92 30- 0.99 22
edad <= 55	0131		66, 16	10	99	0, 0	0,1 7	0, 0	2, 8	0, 0	1.13 45- 7.05 19
	167		33, 84	12	42						
M.D.	099		50, 25	12	73	0, 8	- 0,0	0, 8	0, 9	0, 8	0.36 82- 2.23 84
	198		49, 75	10	67						
M.I.	099		50, 25	10	68	0, 7	0,0 2	0, 7	1, 1	0, 7	0.45 9- 2.79 39
	198		49, 75	12	72						

C.S.E.	0 7 4	49 8 .6 6	55	0, 0,0 4 7 1	0, 1, 4 5 1 1	0, 0, 1 1 1 1	0,56 31- 4,06 22
	1 7 5	50 11 .3 4	50				
C.I.E.	0 1 1 1	74 15 .5 0	78	0, - 6 0,0 6 3	0, 0, 6 7 6 7	0, 0, 6 6 6 7	0,23 51- 2,52 36
	1 3 8	25 4 .5 0	27				
C.S.I.	0 9 1	61 13 .0 7	63	0, - 4 0,0 8 6	0, 0, 4 6 9 9	0, 0, 4 4 9 9	0,24 39- 1,96 48
	1 5 8	38 6 .9 3	42				
C.I.I.	0 1 1 3	75 14 .8 4	81	0, 0,0 7 2 4	0, 1, 7 2 4	0, 0, 7 7 4	0,39 40- 3,68 72
	1 3 6	24 5 .1 6	24				
C.C.	0 1 4 0	93 18 .3 3	97,8	0, - 7 0,0 1 3	0, 0, 7 6 1 3	0, 0, 7 7 1 3	0,07 93- 5,71 87
	1 1 0	6. 1 67					
CARCINOM A DUCTAL INFILTRAN TE SIN TIPO ESPECIAL	0 2 9	14 2 .6 5	21	0, 0,0 4 5 6	0, 1, 4 7 7 5	0, 0, 4 4 7 7	0,38 05- 8,04 7

LAR INVASOR		1	4	2,	1	3					
				02							
CARCINOM A CON DIFERENCI ACIÓN APOCRINA	0 1 9 8	10 0	22	141	*	**	*	*	*	**	
	1										
CARCINOM A METAPLÁSI CO	0 1 9 6	98 ,9 9	21	140	0, 1 2	0,1 1	0, 1 3	6, 6 6	0, 1 8	0,40 15- 110, 677 3	
	1 2	1, 01	1	1							
NOTTI NGHA M	3 a 5	0 1 5 8	79 ,8	22	112	0, 0 1	- 0,1 8	0, 0 1	*	*	**
		1 4 0	20 ,2	0	29						
	6 a 7	0 8 7	43 ,9 4	14	53	0, 0 2	-18 0 2	0, 0 2	0, 3 4	0 0 0	0,13 53- 0,87 49
		1 1 1 1	56 ,0 6	8	88						
	8 a 9	0 1 5 1	76 ,2 6	8	117	0	0,3 7	0	8, 5	0, 0	3.22 31- 22.5 811
		1 4 7	23 ,7 4	14	24						
	leve_modsev	0 4 0	20 ,2	22	29	0,1 8	0, 0	*	*	**	
							1				

HER-2	0 7 2	36 10 ,3 6	53	0, - 4 0,0 8 1	0, 1, 8 0 9 7	0, 0, 8 8 7 0	1, 0, 0 8 0 8	0,61 86- 1,85 57
	1 9 9	50 8	76			0, 0, 5 2 5 5	0,20 65- 1,50 69	
	2 1 5	7, 2 58	3			3, 0, 5 1 3 9	0,52 18- 23,9 218	
	3 1 2	6, 2 06	9			1, 0, 1 8 7 4	0,22 07- 6,28 52	
KI-67	0	25,27 (19,0 6)	22/42,2 7/21,53 /	141/22, 09/16,6 5	0,3 0 3	0 1, 0, 0 0 4 0	1.02 58- 1.07 32	
	1							
KI>40	0 1 6 9	85 13 ,3 5	127	0 0,3 0	0 6, 0, 2 0 8 0	0, 2.27 96- 17.3 015		
	1 2 9	14 9 ,6 5	14					
INVASIÓN LINFOVASC ULAR	0							
	1							
INVASIÓN PERINEURA L	0							
	1							
SUBTIP OS MOLE CULAR ES	LUMINAL A 0 1 0 8	54 20 ,8 2	67	0 - 0,2 9	0 0, 0, 0 0 9 0	0, 0, 0 0 0 0	0.02 06- 0.40 76	

Figura 17:

TILs y Nottingham

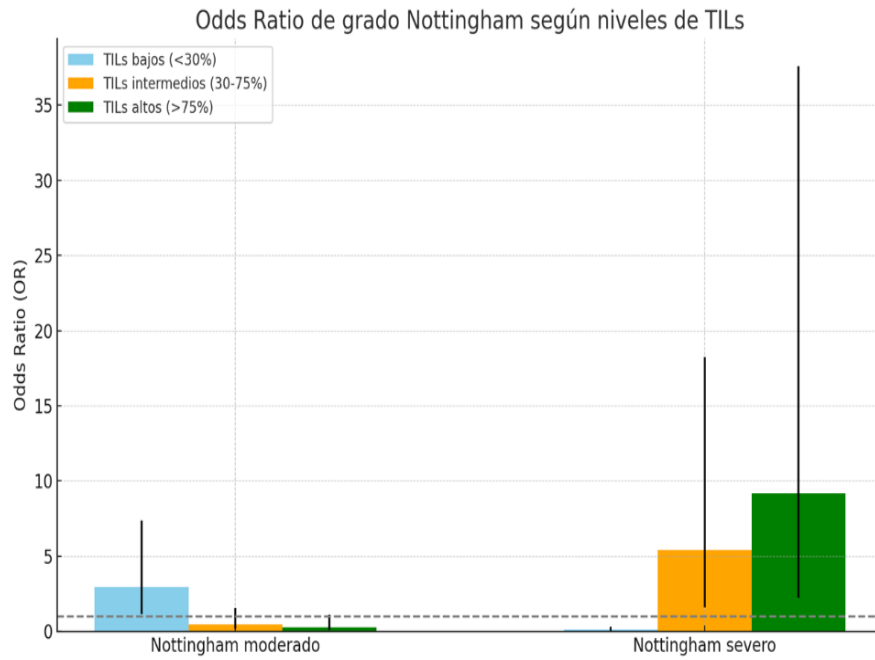


Figura 18:

TILs y subtipos moleculares

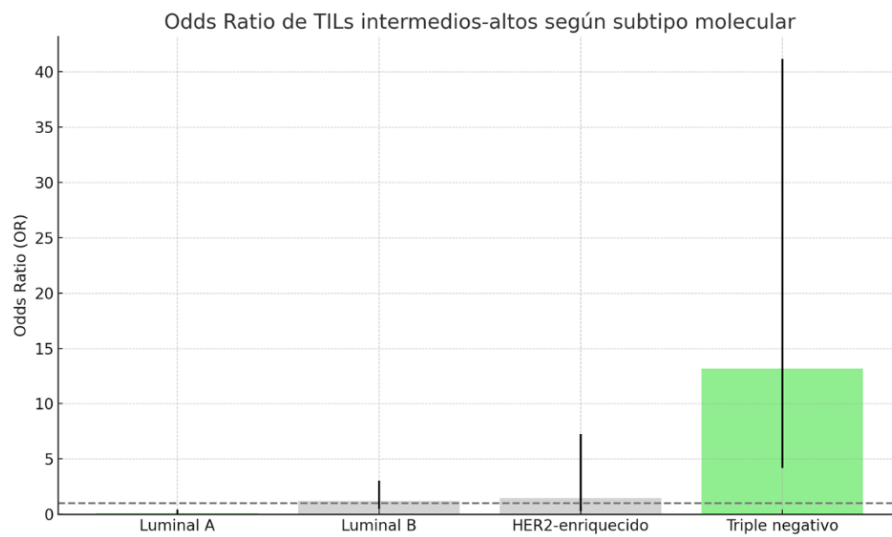


Figura 19:

TILs y KI-67

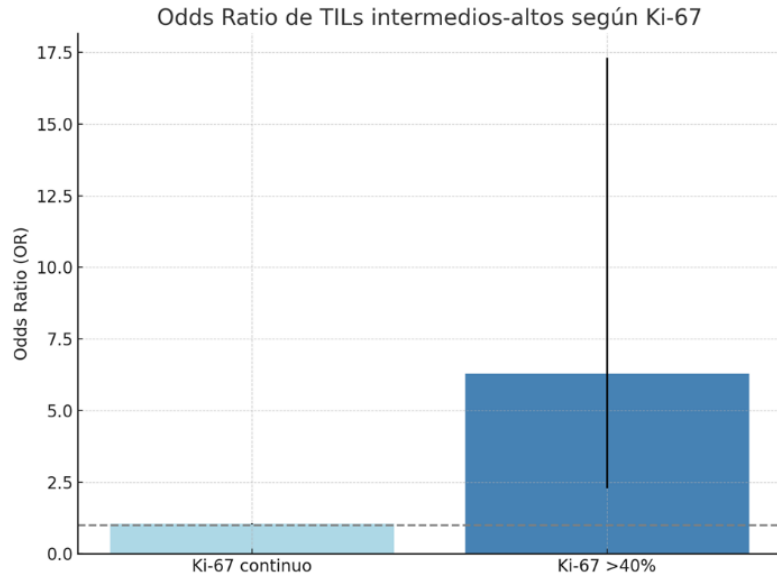


Figura 20:

TILs y receptores hormonales

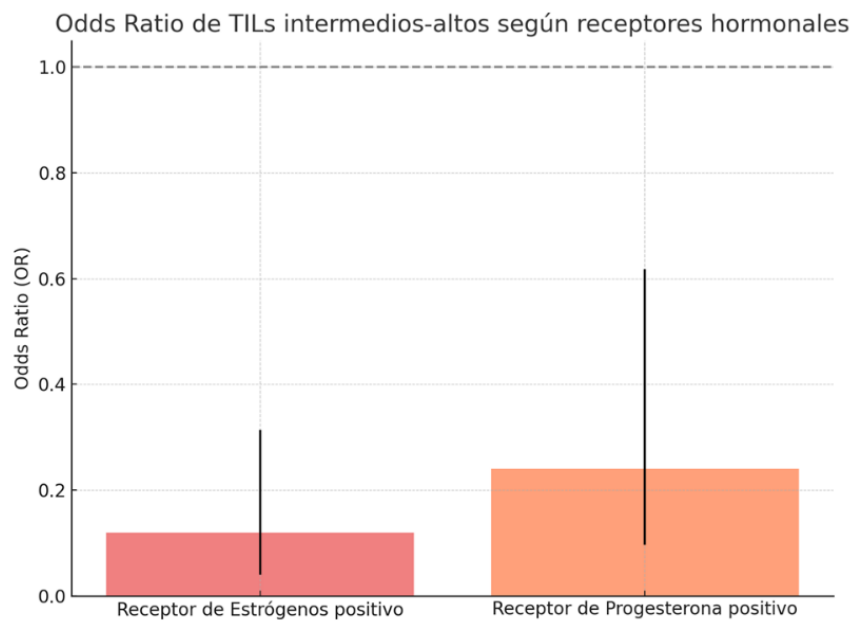
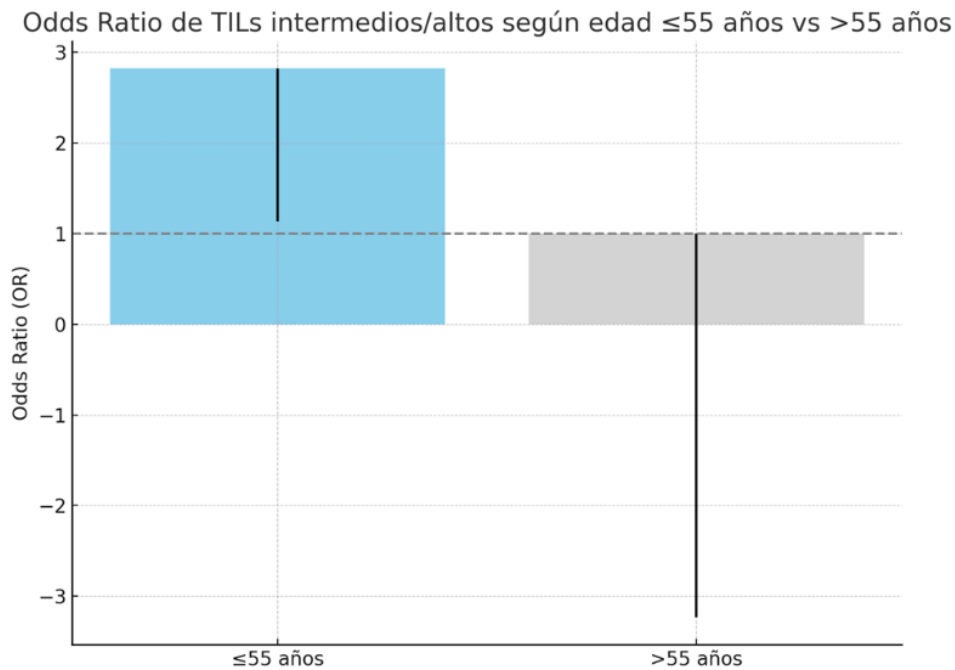


Figura 21:*TILs y edad***Tabla 16:***TILs e invasiones*

	TILs bajo	TILs intermedio	TILs alto
invasión linfovascular	OR:1,01; p=0,98; ic95%:0.2130-4.8404	OR:1,10; p=0,92; ic95%:0.1300-9.3560	OR:0,88; p=0,91; ic95%:0.1068-7.4093
invasión perineural	**	**	**
invasión ganglionar	OR:1,6; p=0,72; ic95%:0.1219-20.9933	OR:0,62; p=0,72; ic95%:0.0476-8,2005	**

Tabla 17:*Análisis bivariado entre invasión linfovascular y demás variables.*

	N	MEAN/ SD	%	INVASION LINFOVASCU LAR+ (17)	INVASION LINFOVAS CULAR-- (148)	P	CO EF CO RR	P	OR	P	IC 95 %
TIPO DE MUESTRA	19 8										
EDAD	19 8	61,11/12, 96		57/9,71	61,55/13,21	0, 1 4	-0,01	0,1 4	0,9 7	0,1 4	.93 86- 1.0 095
M.D.	0 99		50,2 5	10	89	0, 8 2	-0,01	0,8 2	0,9 2	0,8 2	.34 90- 2.3 207
	1 98		49,7 5	9	89						
M.I.	0 99		50,2 5	9	90	0, 7 9	0,01	0,7 9	1,1 3	0,7 9	0 .44 06- 2.9 302
	1 98		49,7 5	10	88						
C.S.E	0 74		49,6 6	2	55	0, 5 2	0,05	0,5 3	1,5 2	0,5 2	0,4 113 - 5,6 291
	1 75		50,3 4	6	60						

CARCINOMA MICROINVASIVO	0	19	99,3	19	178	0,7	-0,02	0,7	**	**	**
		7	9			4		4			

	1	1	0,61	0	1						
--	---	---	------	---	---	--	--	--	--	--	--

CARCINOMA LOBULILLAR INVASIVO	0	18	91,5	17	167	0,5	0,04	0,5	0,6	0,5	0,3
		4	2			3		3	3	4	379

	1	14	8,48	2	12						7,9
											322

CARCINOMA TUBULAR	0	19	100	19	179	*	**	**	**	**	**
		8				*					

	1										
--	---	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

CARCINOMA CRIBIFORME	0	19	100	19	179	*	**	**	**	**	**
		8				*					

	1		0		0						
--	---	--	---	--	---	--	--	--	--	--	--

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

CARCINOMA MUCINOSO	0	18	95,4	19	170	0,3	-0,07	0,3	**	**	**
	1	9	5			1		1			

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

	1	9	4,55	0	9						
--	---	---	------	---	---	--	--	--	--	--	--

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

CISTADENOCARCINOMA MUCINOSO	0	19	100	19	179		**	**	**	**	**
	1	8									

	1	0									
--	---	---	--	--	--	--	--	--	--	--	--

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

CARCINOMA MICROPAPILAR INVASOR	0	19	97,9	17	177	0,1	0,19	0,0	10,4	0,0	1,3
	1	4	8			8		1	4	2	781

-
78,
656
9

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

	1	4	2,02	2	2						
--	---	---	------	---	---	--	--	--	--	--	--

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

CARCINOMA CON DIFERENCIACIÓN APOCRINA	0	19	100	19	179	*	**	**	**	**	**
	1	8				*					

1

CARCINOMA METAPLÁSICO	0	19	98,9	19	177	0,64	-0,03	0,64	**	**	**
-----------------------	---	----	------	----	-----	------	-------	------	----	----	----

1 2 1,01 0 2

NOTTINGHAM	3 a 5	0	15	79,8	18	140	0,08	-0,12	0,08	0,19	0,12	0,0258
------------	-------	---	----	------	----	-----	------	-------	------	------	------	--------

	1	40	20,2	1	39							1,5409
--	---	----	------	---	----	--	--	--	--	--	--	--------

	6 a 7	0	87	43,94	10	77	0,42	-0,05	0,42	0,67	0,4	0,2633
--	-------	---	----	-------	----	----	------	-------	------	------	-----	--------

	1	11	56,0	9	102							1,7530
--	---	----	------	---	-----	--	--	--	--	--	--	--------

	8 a 9	0	12	75,7	9	16	0,02	0,18	0,02	3,22	0,02	1,1507
--	-------	---	----	------	---	----	------	------	------	------	------	--------

	1	40	24,2	8	32							9,0224
--	---	----	------	---	----	--	--	--	--	--	--	--------

leve_modsev	0	40	20,2	1	39	0,08	0,12	0,08	5,01	0,12	0,648387
-------------	---	----	------	---	----	------	------	------	------	------	----------

	1	12	6,09	3	9						
TRIPLE NEGATIVO	0	17	89,8	15	162	0,0	0,11	0,0	2,7	0,1	0,7
		7	5			9		9		1	997
											9,1
	1	20	10,1	4	16						149
			5								
TAMAÑO DE LA NEOPLASIA			31	22,6/22,50	8/38,25/33,22	23/17,21/14,82	**	**	**	**	**
EXTENSION A GANGLIOS LINFÁTICOS REGIONALES											
METÁSTASIS A DISTANCIA											

Figura 22:

Invasión linfovascular y localización

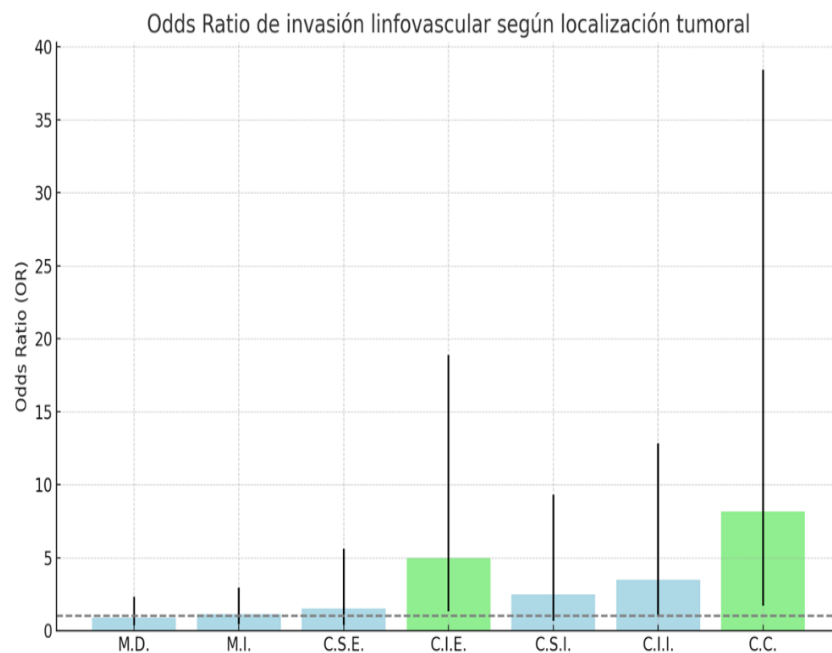


Figura 23:

Invasión linfovascular y receptores hormonales

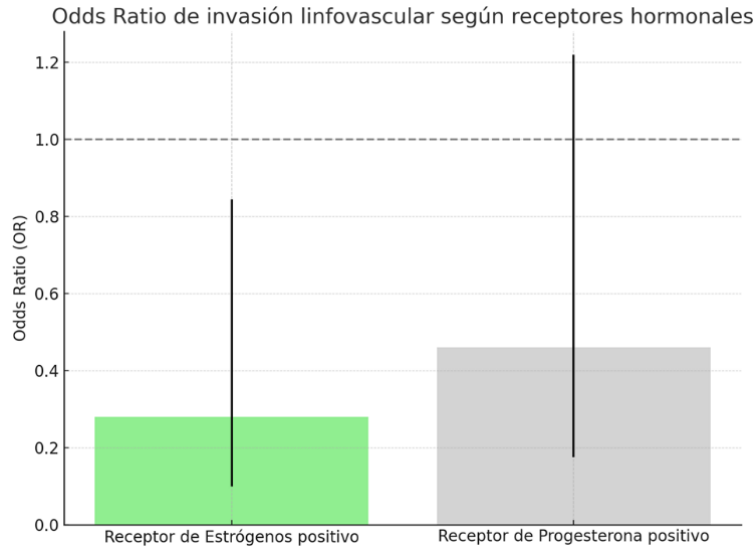


Figura 24:

Invasión linfovascular y Nottingham

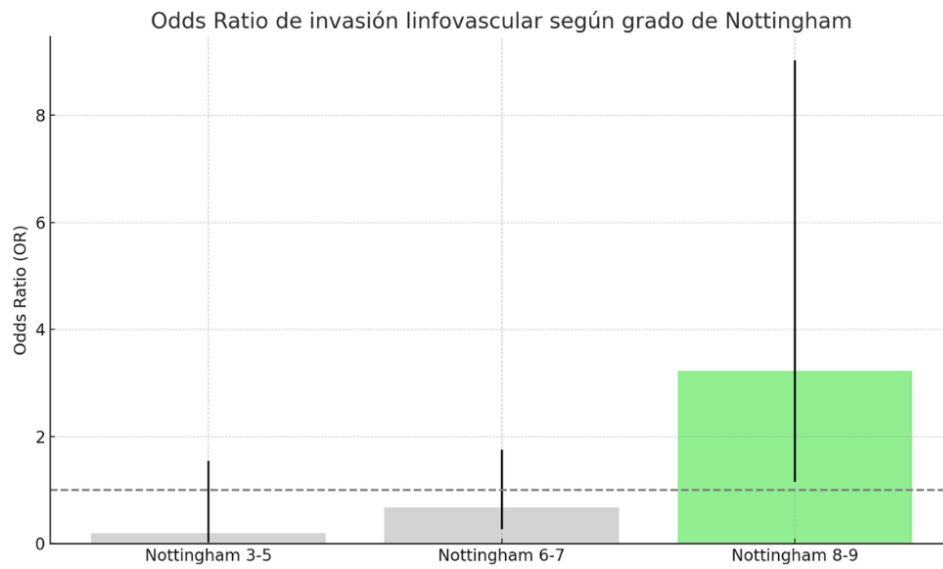


Tabla 18:

Análisis bivariado entre grado de Nottingham severo (pobremente diferenciado), edad menor o igual a 45 años, receptores de progesterona y nivel de TILs intermedios-altos

Nottingham severo	Odds Ratio	Std. Err.	z	P>z	[95% Conf.	Interval]
EDAD<=45	3,49	1,98	2,21	0,03	1,15	10,58
receptor progesterona	0,22	0,10	-3,47	0,00	0,09	0,51
TILS interm/altos	5,66	3,04	3,22	0,00	1,96	16,24
_cons	0,49	0,17	-2.01	0,04	0,24	0,98

11.3 Análisis multivariado

El presente estudio realizado a partir de una cohorte de 198 especímenes quirúrgicos de cáncer de mama con una edad promedio de 61,11 +/- 12,96 con antecedentes de presencia de receptores de progesterona en un 73.23% y TILs intermedio alto con una prevalencia del 13.5% permitió probar un modelo de predicción de score Nottingham severo con una sensibilidad del 39.47% especificidad del 96.8% con una correcta clasificación de casos en un 83.44% y un área bajo la curva ROC de 0.7647 con una bondad de ajuste y una validación interna adecuada. (Ver tablas 19 y 20, figura 25).

Log de Nottingham severo en cáncer de mama = $-0.7205 + 1.2508$ (edad menor o igual a 45 años) -1.5117 (receptores de progesterona) $+ 1.7326$ (TILS INTERMEDIO/ALTO)

Tabla 19:*Variables del modelo de predicción*

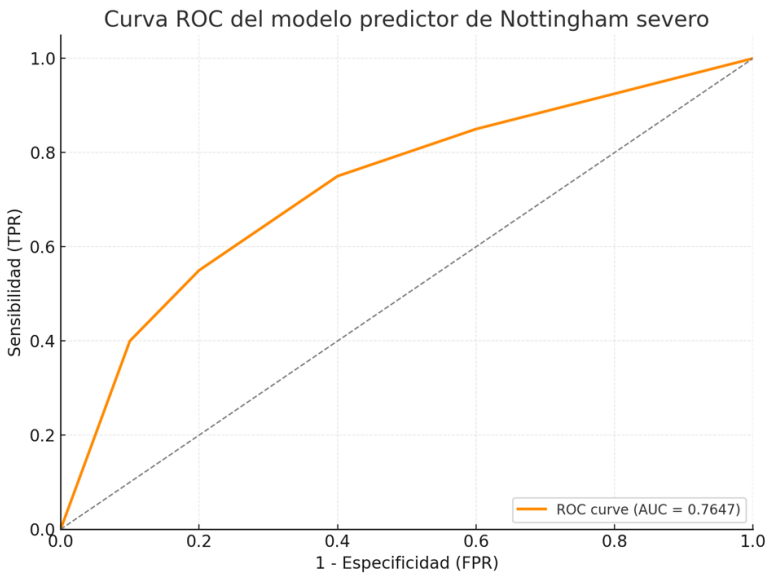
Variable	OR	p-valor	IC 95%	Interpretación
Edad \leq 45 años	3,49	0,03	1.15 – 10.59	Riesgo 3,5 veces mayor
Receptor de progesterona (+)	0,22	0,001	0.09 – 0.52	Reducción del riesgo en 78% (factor protector)
TILs intermedios/altos	5,66	<0.001	1.97 – 16.25	Riesgo 5,7 veces mayor

Tabla 20:*Desempeño del modelo*

Desempeño del modelo	
Métrica	Valor
Sensibilidad	39,5%
Especificidad	96,8%
Valor predictivo positivo	78,9%
Valor predictivo negativo	84,0%
Correctamente clasificados	83,4%
Área bajo la curva ROC	0,7647

Figura 25:

Curva ROC del modelo predictor de Nottingham severo



12. Discusión

El presente estudio evaluó la asociación entre los niveles de linfocitos infiltrantes de tumor (TILs), el grado histológico de Nottingham, los subtipos moleculares, el índice proliferativo Ki-67, la expresión de receptores hormonales, la invasión linfovascular y la localización tumoral en una cohorte de 198 especímenes de cáncer de mama. Los hallazgos obtenidos aportan evidencia relevante que refuerza el papel de los TILs y de otras variables histopatológicas en la caracterización del microambiente tumoral y en la estratificación pronóstica de esta neoplasia.

12.1. TILs, grado histológico y subtipos moleculares

Se encontró una asociación significativa entre los niveles de TILs y el grado histológico de Nottingham, donde los casos con TILs intermedios y altos presentaron un mayor riesgo de corresponder a tumores de alto grado (Nottingham 8–9) (OR=5,41 y OR=9,18; $p < 0,001$). Este

hallazgo concuerda con lo reportado en estudios previos que sugieren que una mayor infiltración linfocitaria refleja la agresividad biológica del tumor (1,13). Por el contrario, los tumores con TILs bajos mostraron mayor probabilidad de estar asociados a grados moderados (OR=2,96; p=0,02) y una menor probabilidad de corresponder a Nottingham severo (OR=0,11; p<0,001), sugiriendo que los TILs bajos podrían actuar como marcador de tumores menos agresivos.

Asimismo, los resultados mostraron que los tumores triple negativos presentaron una probabilidad 13 veces mayor de exhibir niveles elevados de TILs (OR=13,15; IC95%=4,21–41,14; p<0,001), mientras que el subtipo luminal A mostró una reducción del 91% en la probabilidad de infiltración linfocitaria (OR=0,091; IC95%=0,021–0,408; p<0,001). Estos hallazgos son consistentes con la literatura, que describe una mayor densidad de TILs en tumores triple negativos y HER2-enriquecidos, probablemente por su alta inmunogenicidad y mayor carga mutacional, lo que desencadena una respuesta inmune más robusta (1,13,16). En contraste, los tumores luminal A, caracterizados por un microambiente inmunológicamente “frío”, mostraron una infiltración linfocitaria escasa, fenómeno que podría estar influenciado por el efecto inmunomodulador de las hormonas sexuales (17,18).

Estos hallazgos apoyan el valor de los TILs como biomarcador pronóstico y predictor de respuesta terapéutica, especialmente en tumores triple negativos, donde se ha demostrado que la presencia de TILs elevados se correlaciona con mejor respuesta a quimioterapia neoadyuvante e inmunoterapia (19,20).

12.2. TILS, proliferación tumoral y receptores hormonales

Se identificó una asociación positiva entre niveles elevados de Ki-67 y presencia de TILs intermedios-altos. Cada incremento del 1% en Ki-67 aumentó un 4% la probabilidad de infiltración linfocitaria (OR=1,04; p<0,001), y los tumores con Ki-67 >40% mostraron una probabilidad 6,3

veces mayor de TILs elevados (OR=6,28; $p<0,001$). Este hallazgo coincide con reportes previos que demuestran que los tumores con alta proliferación celular presentan mayor infiltración inmune, probablemente como respuesta al aumento en la exposición antigénica (21,22).

En cuanto a los receptores hormonales, la positividad al receptor de estrógenos se asoció con una reducción significativa de la probabilidad de TILs intermedios-altos (OR=0,28; $p=0,02$), mientras que la positividad al receptor de progesterona mostró una tendencia similar sin significancia estadística. Estos hallazgos refuerzan la hipótesis de que los tumores hormonodependientes presentan menor inmunogenicidad, lo cual concuerda con estudios que reportan menor densidad de TILs en tumores luminales (17,18).

12.3. Edad y respuesta inmune

Las pacientes de 45 años o menos presentaron un riesgo 3,5 veces mayor de tener tumores de alto grado (Nottingham severo) y una probabilidad 2,8 veces mayor de mostrar niveles elevados de TILs, en comparación con las pacientes mayores de 55 años. Estos resultados son consistentes con la literatura que indica que los tumores en pacientes jóvenes suelen ser biológicamente más agresivos, pero también más inmunogénicos, con mayor infiltración linfocitaria (1,13,16).

12.4 Invasión linfovascular, grado histológico y localización

La invasión linfovascular (ILV) se asoció significativamente con el grado histológico, siendo más frecuente en tumores de alto grado (OR=3,22; $p=0,02$). Este hallazgo confirma su valor como marcador pronóstico adverso, como se ha descrito previamente (23,24). Además, se observó un mayor riesgo de ILV en tumores localizados en el cuadrante central (OR=8,14; $p=0,01$) y en el cuadrante inferior externo (OR=5,01; $p=0,01$), lo cual podría relacionarse con las características anatómicas de la red linfática en estas regiones (25,26,27).

En relación con los receptores hormonales, la positividad al receptor de estrógenos se asoció con un efecto protector frente a la ILV (OR=0,28; p=0,02), mientras que el receptor de progesterona no mostró significancia estadística. Estos resultados concuerdan con la evidencia que señala una menor propensión a la diseminación linfática en tumores hormonodependientes (23).

12.5. Interpretación general

Los hallazgos de este estudio son consistentes con la evidencia científica disponible y refuerzan la importancia de evaluar los TILs, el grado histológico, los receptores hormonales, Ki-67 y la invasión linfovascular como parámetros complementarios en la estratificación pronóstica del cáncer de mama. Los resultados también respaldan el papel de los TILs no solo como un reflejo de la respuesta inmune, sino como un biomarcador que podría integrarse en la toma de decisiones terapéuticas, especialmente en subtipos de alto riesgo como el triple negativo.

Una de las principales fortalezas de este estudio es el amplio tamaño de muestra de casos incluidos, así mismo es uno de los primeros estudios realizados para determinar la asociación de linfocitos infiltrantes de tumores y variables intrínsecas tumorales con severidad en biopsias y especímenes quirúrgicos de cáncer de mama establecida por escala de Nottingham.

No obstante, se debe considerar que algunas asociaciones no alcanzaron significancia estadística, lo cual podría deberse en parte al tamaño muestral limitado en ciertos subgrupos específicos. En particular, los subtipos moleculares Luminal B y HER2-enriquecido no mostraron asociación significativa con niveles intermedios-altos de TILs, posiblemente debido a su menor representación en la muestra total. Futuros estudios con mayor número de casos, análisis multivariados y validación externa permitirán confirmar y ampliar estos hallazgos.

13. Recomendaciones para otros futuros estudios

Para futuros estudios, se recomienda ampliar el tamaño de la muestra con el fin de alcanzar una mayor representatividad estadística y posibilitar subanálisis más robustos, especialmente en relación con los distintos subtipos moleculares y grados histológicos del cáncer de mama. Asimismo, sería valioso incorporar variables relacionadas con desenlaces clínicos, como la recurrencia, la aparición de metástasis y la supervivencia global, con el propósito de validar el valor pronóstico real de los linfocitos infiltrantes de tumor (TILs). Adicionalmente, se sugiere incluir biomarcadores inmunológicos complementarios, tales como PD-L1, linfocitos T CD8+ y FOXP3, que permitan una caracterización más profunda del microambiente tumoral y su interacción con el sistema inmune. La validación multicéntrica de los resultados en cohortes de distintas instituciones también es fundamental para aumentar la aplicabilidad clínica y generalización de los hallazgos. Por último, se plantea la necesidad de explorar en mayor detalle los mecanismos inmunosupresores presentes en los tumores luminales, caracterizados por un microambiente inmunológicamente “frío”, mediante estudios moleculares y transcriptómicos que contribuyan a esclarecer su biología y potencial terapéutico.

14. Conclusiones

Los resultados del presente estudio demuestran que los linfocitos infiltrantes de tumor (TILs) se asocian significativamente con varias características histopatológicas y moleculares del cáncer de mama. Se evidenció que los tumores con grado histológico alto (Nottingham 8–9) presentaron una probabilidad 9,18 veces mayor de mostrar niveles intermedios-altos de TILs

(IC95%: 2,24–37,56; $p < 0,001$), lo que sugiere que las neoplasias de mayor agresividad histológica desencadenan una respuesta inmune más intensa como mecanismo de contención tumoral.

Desde el punto de vista molecular, el subtipo triple negativo mostró una relación particularmente estrecha con la infiltración linfocitaria, presentando un riesgo 13 veces mayor de TILs elevados (OR=13,15; IC95%: 4,20–41,13; $p < 0,001$). En contraste, el subtipo luminal A se asoció con una reducción del 91% en la probabilidad de presentar TILs intermedios-altos (OR=0,091; IC95%: 0,02–0,40; $p < 0,001$), lo cual refleja el carácter inmunológicamente “frío” de los tumores hormonodependientes.

Asimismo, se identificó una asociación estadísticamente significativa entre la invasión linfovascular y la localización tumoral, observándose que los tumores en el cuadrante inferior externo y cuadrante central presentaron un riesgo aumentado de 5 y 8 veces, respectivamente (OR=5,01; IC95%: 1,33–18,87; $p = 0,01$; OR=8,14; IC95%: 1,73–38,42; $p = 0,01$). Este hallazgo podría explicarse por las particularidades anatómicas del drenaje linfático en dichas regiones.

En relación con los receptores hormonales, la positividad para el receptor de estrógenos se asoció con una reducción significativa del riesgo de invasión linfovascular (OR=0,28; IC95%: 0,09–0,84; $p = 0,02$), mientras que la positividad del receptor de progesterona no alcanzó significancia estadística. Este patrón refuerza la asociación entre la expresión hormonal y un fenotipo menos invasivo.

Por otro lado, los tumores con índices de proliferación elevados (Ki-67 >40%) presentaron una probabilidad 6,3 veces mayor de desarrollar TILs intermedios-altos (OR=6,28; IC95%: 2,28–17,30; $p < 0,001$), lo que indica que una mayor actividad mitótica podría aumentar la inmunogenicidad tumoral.

En términos de factores demográficos, se observó que las pacientes de 45 años o menos tenían un riesgo significativamente mayor de presentar tumores Nottingham severos, con una probabilidad 3,5 veces superior en comparación con mujeres de mayor edad (OR=3,49; IC95%: 1,15–10,59; p=0,03). Este resultado refuerza la relación entre la edad temprana de presentación y un fenotipo más agresivo.

Finalmente, el modelo multivariado de predicción para Nottingham severo mostró una buena capacidad discriminativa, con un área bajo la curva ROC de 0,7647, una especificidad del 96,8% y una sensibilidad del 39,5%, clasificando correctamente el 83,4% de los casos. El modelo integró como predictores significativos a la edad menor o igual a 45 años, la presencia de TILs intermedios-altos y la negatividad para el receptor de progesterona, lo que sugiere una posible utilidad de este enfoque en la estratificación del riesgo histológico en cáncer de mama.

15. Cronograma de actividades

Figura 26:
Cronograma de actividades

ACTIVIDAD	JULIO – OCTUBRE 2023	NOVIEMBRE 2023 – ABRIL 2024	MAYO - JUNIO 2024	JULIO 2024	AGOSTO- NOVIEMBRE 2024	DICIEMBRE 2024- FEBRERO 2025	MARZO – JULIO 2025	JULIO 2025 – ENERO 2026
Elaboración protocolo								
Sustentación y presentación al CEINCI								
Selección de casos para estudio								
Recolección de datos en base de datos de Excel								
Análisis de datos								
Creación documento de resultados								
Publicación de resultados								
Presentación en eventos/publicación								

16. Presupuesto

Figura 27:
Presupuesto

ITEM	RUBRO	FINANCIACION UIS 2023		FINANCIACION UIS 2024		FINANCIACION OTRAS INSTITUCIONES 2023		FINANCIACION OTRAS INSTITUCIONES 2024		TOTAL
		EFFECTIVO	ESPEQUE	EFFECTIVO	ESPEQUE	EFFECTIVO	ESPEQUE	EFFECTIVO	ESPEQUE	
1	HONORARIOS	\$ -	\$ -	\$ -	\$ 90.000.000,00	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ 90.000.000,00
2	ALUMJARES ESTUDIANTILES	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
3	RIESGOS LABORALES ESTUDIANTILES	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
4	SERVICIOS TECNICOS	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
5	PASAJES	\$ -	\$ -	\$ 450.000,00	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ 450.000,00
6	VIATICOS	\$ -	\$ -	\$ 1.000.000,00	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ 1.000.000,00
7	GASTOS DE VIAJE	\$ -	\$ -	\$ 810.000,00	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ 810.000,00
8	EQUIPOS DE LABORATORIO	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
9	MAQUINARIA	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
10	PRACTICAS DOCENTES Y SALIDAS DE CAMPO	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
11	REPARACION Y MANTENIMIENTO	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
12	REACTIVOS Y MATERIALES DE LABORATORIO	\$ -	\$ -	\$ -	\$ 2.130.000,00	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ 2.130.000,00
13	LICENCIAS DE SOFTWARE	\$ -	\$ -	\$ -	\$ 2.037.500,00	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ 2.037.500,00
14	PAPELERIA Y UTILES DE ESCRITORIO	\$ -	\$ -	\$ -	\$ 1.000.000,00	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ 1.000.000,00
15	LIBROS Y MATERIAL BIBLIOGRAFICO	\$ -	\$ -	\$ -	\$ 972.000,00	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ 972.000,00
16	EQUIPO AUDIOVISUAL	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
17	EQUIPO DE OFICINA	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
18	EQUIPO DE COMPUTO	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
19	MUEBLES Y ENSERES	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
20	ELEMENTOS DE LABORATORIO	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
21	herramientas	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
22	MONTAJE E INSTALACIONES	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
23	ADECUACIONES	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
24	ARRENDAMIENTOS	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
25	SEGUROS	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
26	CAPAQTACION DE PERSONAL	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
27	PORTES Y FLETES	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
28	ACARREOS	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
29	AVISOS E IMPRESOS	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
30	SEMOVIENTES	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
31	GASTOS DE IMPORTACION	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
	TOTAL	\$ -	\$ -	\$ 2.260.000,00	\$ 96.139.500,00	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ 98.399.500,00

Referencias bibliográficas

1. 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. *Annals of Oncology* [Internet]. 2015 Feb 1 [cited 2023 Mar 25];26(2):259. Available from: [/pmc/articles/PMC6267863/](#)
2. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2004 [cited 2023 Mar 25];22:329–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15032581/>
3. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, et al. Triple-negative breast cancer: Clinical features and patterns of recurrence. *Clinical Cancer Research*. 2007 Aug 1;13(15):4429–34.
4. Kumar P, Aggarwal R. An overview of triple-negative breast cancer. Vol. 293, *Archives of Gynecology and Obstetrics*. Springer Verlag; 2016. p. 247–69.
5. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Soerjomataram I. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2024;74(2):93–115. doi:10.3322/caac.21834.
6. Alkabban F, Ferguson T. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482286/>. 2023. Breast Cancer.
7. Shousha S. *Breast Pathology*. 1st ed. Shousha S, editor. Vol. 1. Cham: Springer International Publishing; 2017. 90–92 p.

8. Mayrovitz HN. Breast Cancer [Internet]. Mayrovitz HN, editor. Exon Publications; 2022. Available from: <https://exonpublications.com/index.php/exon/issue/view/breast-cancer-open-access-book>
9. Kazemi MH, Sadri M, Najafi A, Rahimi A, Baghernejadan Z, Khorramdelazad H, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes for treatment of solid tumors: It takes two to tango? Vol. 13, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2022.
10. Ruffell B, Au A, Rugo HS, Esserman LJ, Hwang ES, Coussens LM. Leukocyte composition of human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Feb 21;109(8):2796–801.
11. 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. *Annals of Oncology*. 2014;25(8):1536–43.
12. Kos Z, Roblin E, Kim RS, Michiels S, Gallas BD, Chen W, et al. Pitfalls in assessing stromal tumor infiltrating lymphocytes (sTILs) in breast cancer. *NPJ Breast Cancer*. 2020 Dec 1;6(1).
13. Denkert C, von Minckwitz G, Darb-Esfahani S, Lederer B, Heppner BI, Weber KE, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *Lancet Oncol*. 2018 Jan 1;19(1):40–50.
14. Pfeifer JD, DLP, & HPA. *Manual Washington de patología quirúrgica*. 3rd ed. Wolters Kluwer Health; 2021.

15. Magaki S, Hojat SA, Wei B, So A, Yong WH. An introduction to the performance of immunohistochemistry. In: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc.; 2019. p. 289–98.
16. Loi S, Sirtaine N, Piette F, et al. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer. *J Clin Oncol*. 2014;31(7):860–7. doi:10.1200/JCO.2011.41.0902.
17. Miyoshi Y, et al. Associations in tumor infiltrating lymphocytes between clinicopathological factors and clinical outcomes in ER-positive/HER2-negative breast cancer. *Oncol Lett*. 2019;17(2):2177–2186. doi:10.3892/ol.2018.9853.
18. Rivadeneira DB, Delgoffe GM. Immune metabolism in the tumor microenvironment. *Cancer Lett*. 2021;502:60–72. doi:10.1016/j.canlet.2020.09.038.
19. Adams S, Gray RJ, Demaria S, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancers from two randomized adjuvant breast cancer trials. *J Clin Oncol*. 2014;32(27):2959–66. doi:10.1200/JCO.2013.55.0491.
20. Ribas A, Wolchok JD. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science*. 2019;359(6382):1350–1355. doi:10.1126/science.aar4060.
21. Hashmi AA, et al. Ki67 index in intrinsic breast cancer subtypes and its association with prognostic parameters. *Oncol Lett*. 2019;17(2):2177-2186. doi:10.3892/ol.2018.9853.
22. *Frontiers in Oncology*. Ki67 Index Changes and Tumor-Infiltrating Lymphocyte Levels: Prognostic Influence in Triple-Negative Breast Cancer. *Front Oncol*. 2021;11:668610. doi:10.3389/fonc.2021.668610.
23. Rakha EA, Martin S, Lee AH, Morgan D, Ellis IO. The prognostic significance of lymphovascular invasion in invasive breast carcinoma. *Cancer*. 2012;118(15):3670–3680. doi:10.1002/cncr.26646.

24. Mohammed RA, Ellis IO, Mahmmod AM, et al. Lymphatic and blood vessel invasion in breast cancer: prevalence, prognostic impact and pathobiological mechanisms. *Histopathology*. 2014;65(1):87-93. doi:10.1111/his.12372.
25. Sato M, et al. Lymphatic vessel density and invasion in relation to the location of breast carcinoma. *Histopathology*. 2016;68(5):716-724. doi:10.1111/his.12800.
26. Tan LK, Giri D, Hummer AJ, et al. Location of breast cancers in relation to the nipple: implications for conservative surgery. *Cancer*. 2015;103(4):730-737. doi:10.1002/cncr.20844.
27. Yu JI, Park W, Huh SJ, et al. Lymphatic drainage patterns of breast cancer: implications for radiation therapy. *Radiother Oncol*. 2018;126(1):81-88. doi:10.1016/j.radonc.2017.10.006.

Apéndices

Apéndice A:

Instrumentos para la recolección de variables

EDAD										
LOCALIZACIÓN ANATÓMICA DE LA NEOPLASIA	M. D.	M. I.	C.S.E.	C.I.E.	C.S.I.	C.I.I.	C.C			
SUBTIPO HISTOLÓGICO DE CARCINOMA DE MAMA	CARCINOMA DUCTAL INVASOR DE TIPO NO ESPECIAL	CARCINOMA MICROINVASIVO	CARCINOMA LOBULILLAR INVASIVO	CARCINOMA TUBULAR	CARCINOMA CRIBIFORME	CARCINOMA MUCINOSO	CISTADENOCARCINOMA MUCINOSO	CARCINOMA MICROPAPILAR INVASOR	CARCINOMA CON DIFERENCIACIÓN APOCRINA	CARCINOMA METAPLÁSICO
SCORE DE NOTTINGHAM	3 a 5	6 a 7	8 a 9							
PRESENCIA DE TILS	BAJOS (<30%)	INTERMEDIOS (30- <75%)	ALTOS (>75%)							
SUBTIPO MOLECULAR	LUMINAL A	LUMINAL B	HER-2	TRIPLE NEGATIVO						
TAMAÑO DE LA NEOPLASIA										
EXTENSIÓN A GANGLIOS LINFÁTICOS REGIONALES										
METÁSTASIS A DISTANCIA										
MD: MAMA DERECHA, MI: MAMA IZQUIERDA, CSE: CUADRANTE SUPERIOR EXTERNO, CIE: CUADRANTE INFERIOR EXTERNO, CSI: CUADRANTE SUPERIOR INTERNO, CII: CUADRANTE INFERIOR INTERNO, CC: CUADRANTE CENTRAL, TILS: LINFOCITOS INFILTRANTES DE TUMORES										