

**DETECCIÓN MOLECULAR DE MICROMETÁSTASIS EN EL GANGLIO
CENTINELA EN CÁNCER DE MAMA ESTADIO TEMPRANO. VALOR
PRONÓSTICO.**



LUZ FERNANDA SUA VILLEGAS MD, PhD

Médico y Cirujano

Especialista en Anatomía Patológica y Patología Clínica

UNIVERSIDAD DEL VALLE

FACULTAD DE SALUD

ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Santiago de Cali

2015

**DETECCIÓN MOLECULAR DE MICROMETÁSTASIS EN EL GANGLIO
CENTINELA EN EL CÁNCER DE MAMA ESTADIO TEMPRANO: correlación
con la técnica histopatológica convencional (Coloración de Hematoxilina y
Eosina e Inmunohistoquímica) y su valor pronóstico.**



LUZ FERNANDA SUA VILLEGAS MD, PhD

Documento presentado para optar al título de doctor en ciencias biomédicas

MARÍA LUISA MAESTRO DE LAS CASAS PhD

MARTA VIDAURRETA LÁZARO PhD

DIRECTORAS

CARMENZA MACÍA MEJÍA MD

TUTORA

UNIVERSIDAD DEL VALLE

FACULTAD DE SALUD

ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Santiago de Cali

2015

Nota de aceptación:

Firma del jurado

Firma del jurado

DEDICATORIA

“La vida no es fácil, para ninguno de nosotros. Pero... ¡qué importa! Hay que perseverar y, sobre todo, tener confianza en uno mismo. Hay que sentirse dotado para realizar alguna cosa y que esa cosa hay que alcanzarla, cueste lo que cueste.”

Marie Curie (1867-1934)

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Luisa Maestro de las Casas, por recibirme en su grupo de investigación en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid y ser incondicional en estos años. Me mostro el camino incierto de la investigación, a aprenderá persistir, a trabajar todos los días por un objetivo y a creer que si se puede.

Muchas gracias al Dr. José Román, Dra. Marta Vidaurreta, Dra. Sara Rafael, Dra. Silvia Veganzones, Dra. Virginia de la Orden y a las técnicas moleculares María del Carmen Díaz, Beatriz Mediero y Encarna Jerez, sin ellos hubiese sido imposible presentar este resultado de investigación y a la Dra. Carmenza Macía Mejía, mi tutora en la Fundación Valle del Lili, por esas horas en el microscopio, por la paciencia, guía y apoyo durante estos años.

Y quiero agradecer a una persona que sin ella no hubiese sido posible conocer a la Dra. Maestro, mi profesor el Dr. Pedro Rovetto quien tiene razón cuando dice: **“Haber descubierto algún fragmento de verdad científica no lo hace a uno necesariamente sabio ni buena persona”**.

Y a ese ser amado que cambio la perspectiva de mi vida, a mi abuela la que amo con toda mi alma y a mi familia los cuales son la fortaleza y mi apoyo para querer siempre ser mejor.



Hospital Clínico San Carlos



FUNDACIÓN
VALLE DEL LILI

Excelencia en Salud al servicio de la comunidad

CONTENIDO

RESUMEN	14
ABSTRACT	16
2. INTRODUCCIÓN.....	18
2.1 EVOLUCIÓN Y CONCEPTOS GENERALES EN EL MANEJO Y DIAGNOSTICO DEL CANCER DE MAMA	20
2.1.2. Reseña histórica.....	20
2.1.2. Concepto del ganglio centinela	23
2.1.3. Exploración física	24
2.1.4 Técnicas radiológicas	24
2.2. EPIDEMIOLOGÍA	31
2.2.1. Incidencia.....	31
2.2.2. Mortalidad	33
2.2.3. Tendencia actual	34
2.3. FACTORES DE RIESGO	35
2.4. HISTORIA NATURAL DEL CÁNCER DE MAMA.....	42
2.4.1 Micrometástasis y técnicas utilizadas para su determinación	48
2.5. GANGLIO CENTINELA	50
2.5.1. Indicaciones de la técnica del ganglio centinela.....	56
2.5.3. Controversias en la utilización de la técnica del ganglio centinela.....	58
2.5.4. Factores pronóstico del ganglio centinela	59
2.5.5 Factores pronóstico clásicos	60
2.5.6 Factores pronostico biológicos.....	63
2.6 Citoqueratinas (CK)	72
2.6.1 Citoqueratina 19 (CK19).....	72
2.7 Mamaglobina (hMAG)	73
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	74
4. JUSTIFICACIÓN.....	75

5. OBJETIVOS	76
5.1 OBJETIVO GENERAL	76
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	76
6. METODOLOGÍA	77
6.1 DISEÑO DEL ESTUDIO	77
6.1.2 Población de estudio y tamaño de la muestra	77
6.1.3 Criterios de exclusión	77
6.1.4 Criterios de inclusión	78
6.3 PROCEDIMIENTO REALIZADO	78
6.3.1. Metodología clínica	79
6.3.2. Etapa operatoria	81
6.3.3 Metodología analítica	84
6.4.1 Técnica de Biología Molecular	87
6.3.4 Metodología estadística	93
7. RESULTADOS	94
7.1 Descripción de la población	94
7.2 Ganglio linfático	95
7.3 Características clínicas	96
7.4 Características inmunohistoquímicas y patológicas	96
7.5 Capacidad predictiva de Mamaglobina, Citoqueratina 19 y de CK19 más Mamaglobina	98
7.6 Resultados análisis de supervivencia	103
8. DISCUSIÓN	74
9. CONCLUSIONES	83
10. PERSPECTIVAS	85
11. ANEXOS	98
11.1 Estudio integridad de RNA	98
11.2 Extracción de RNA en tejido	99
11.3. Preparación de geles poliacrilamida	101
11.4 Protocolo de Amplificación de DNAC de Citoqueratina 19	104
11.5 Protocolo de amplificación de DNAC mamaglobina	106
11.6 Aval ético	108
11.7 Artículo publicado 1	109
11.8 Artículo publicado 2	110

11.9 Artículo publicado 3.....	111
11.10 Artículo publicado 4.....	112

RESUMEN

Introducción: La biopsia selectiva del ganglio centinela es el procedimiento de elección para la estadificación axilar del cáncer de mama y permite seleccionar un subgrupo de pacientes en las que la linfadenectomía no aporta ningún beneficio adicional. Se recomienda estudiar el ganglio centinela en su totalidad a fin de evitar sesgos de localización de las metástasis, por lo que la inclusión de técnicas moleculares para estudio, permite cumplir con esta meta. El objetivo de esta investigación fue desarrollar la metodología y técnica molecular requerida para el estudio de biopsias de ganglios centinela en cáncer de mama temprano (hasta 3 cm), empleando la expresión diferencial de los genes Mamaglobina y Citoqueratina 19 (CK19), mediante la RT-PCR (PCR transcriptasa reversa y qPCR (PCR en tiempo real)

Metodología: Durante el periodo de Octubre 2004 a Marzo 2010 se incluyeron en el estudio 301 pacientes del Hospital Clínico San Carlos de Madrid España (HCSC) en estadio I y II de cáncer de mama. A todas se les realizó la técnica quirúrgica del ganglio centinela, identificación de metástasis ganglionar por las técnicas histológicas convencionales, tales como: congelación, impronta, coloración de hematoxilina y eosina (H&E) e Inmunohistoquímica (IHQ). Se recolectaron muestras congeladas a -80°C para la extracción de RNA y el estudio molecular por RT-PCR y qPCR para los genes Mamaglobina y CK19. Los análisis estadísticos se realizaron empleando el software STATA 12.0. La asociación entre Mamaglobina y CK19 se determinó por la prueba exacta de Fisher. La validez diagnóstica: sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) se determinaron con un nivel de confianza del 95%, donde la pruebas *Gold estándar* fueron H&E y la combinación H&E+IHQ. El análisis de supervivencia para la expresión de Mamaglobina y CK19 (RT-PCR y qPCR), H&E y la combinación H&E+IHQ se estimó por la prueba de Kaplan-Meier

y las diferencias entre estas por el test de Log-Rank.

Resultados: La determinación de la positividad según la técnica molecular fue: para CK19 de 12.29 % vs Mamaglobina con 16.61% y al combinar los dos genes de 18.6%, en comparación a H&E con 15.61% y siendo comparable con la H&E+IHQ con un 19.27%. La sensibilidad de la prueba fue de 68.9%, y la especificidad del 93.42%, VPP del 71.43 % y VPN del 92.65 % estos resultados correspondieron al estudio de una fracción aleatoria del ganglio centinela. Los resultados del análisis de supervivencia no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre las curvas de supervivencia de acuerdo al resultado del test (positivo y negativo), sin embargo al cabo de 5 años las diferencias fueron notorias en H&E (73.9% Vs 89.9%), H&E+IHQ (74.3% Vs 89.9%) y la expresión de los genes de Mamaglobina y CK19 (78.2% Vs 89.9%).

Conclusión: La detección de micrometástasis en ganglio centinela, mediante la expresión en conjunto de los genes de mamaglobina y CK19, permiten obtener valores de detección en menor tiempo y similar valor clínico a los obtenidos por las técnicas *Gold estándar* H&E H&E+IHQ. Los beneficios de la implementación de la técnica molecular (expresión de mamaglobina y CK19) permitirían evitar segundas intervenciones puesto que el estudio completo del ganglio se podría realizar durante el tiempo quirúrgico.

Palabras claves: Mamaglobina, CK19, ganglio centinela, cáncer de mama temprano, RT-PCR, PCR y qPCR.

ABSTRACT

Introduction: Selective biopsy of the sentinel lymph node is the election procedure for axillary staging of breast cancer. It allows the selection of a subgroup of patients in whom lymphadenectomy doesn't contribute with an additional benefit. The recommendation consists in study the totality of the sentinel lymph node to avoid metastasis location bias. Inclusion of molecular techniques in studies contributes to achieve this goal. The objective of this research was to develop the methodology and molecular technique required to the study of sentinel ganglion biopsies in early stage breast cancer (<3 cm), employing the differential expression of mammaglobin and cytokeratin 19 (CK19) genes through RT-PCR (reverse transcription PCR) and qPCR (real-time PCR).

Methods: Between October 2004 and March 2010, 301 patients with breast cancer, stages I and II, from Hospital Clínico San Carlos de Madrid España, were included. They underwent surgical technique of sentinel lymph node and identification of nodal metastases with conventional histologic techniques such as: frozen section, imprint, coloration with hematoxylin and eosin (H&E) and immunohistochemistry (IHC). Frozen samples at -80°C were collected for RNA extraction and molecular study with RT-PCR and qPCR for the genes mammaglobin and CK19. Statistical analysis was done with the software STATA 12.0. Association between mammaglobin and CK19 was determined with exact Fisher test. Diagnostic validity, including sensitivity (S), specificity (E), positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV), were determined within a confidence interval of 95%, were the gold standard tests were H&E and the combination H&E+IHC. Survival analysis for the expression of mammaglobin and CK19 (RT-PCR and qPCR), H&E and H&E+IHC was estimated with Kaplan-Meier test and the differences between them with Log-Rank test.

Results: Positivity with the molecular technique was 12.29% for CK19 vs. 16.61%

for mammaglobin, the result was 18.6% combining both genes in comparison to 15.61% with H&E, which was comparable to 19.27% for H&E+IHQ. Test sensitivity was 68.9% and specificity was 93.42%. PPV was 71.43% and NPV was 92.65%. There weren't statistically significant differences between the survival curves according to the result of the test (positive or negative), however, in the 5-years-follow-up the differences were evident for H&E (73.9% Vs 89.9%), H&E+IHQ (74.3% Vs 89.9%) and the expression of the genes mammaglobin and CK19 (78.2% Vs 89.9%).

Conclusion:

Detection of micrometastases in the sentinel lymph node with the expression of the genes mammaglobin and CK19, allows to obtain detection values in less time with a similar clinical value compared to the results from the gold standard techniques: H&E and H&E+IHQ. Benefits of implementation of the molecular technique (expression of mammaglobin and CK19) would prevent second interventions thanks to the entire study of the lymph node within the surgical time.

Key words: mammaglobin, CK19, sentinel ganglion, early stage breast cancer, RT-PCR, PCR and qPCR.

2. INTRODUCCIÓN

Aproximadamente siete millones de personas mueren en el mundo cada año a causa del cáncer. Se espera que en el año 2020 mueran 10 millones de personas(1). El cáncer en países desarrollados provoca el 12.6% de todas las muertes, según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS). La incidencia ha aumentado progresivamente en los últimos años debido al incremento de los factores de riesgo que predisponen hacia algunos tipos de tumores y al envejecimiento de la población.

Se estima que solo en la unión europea para el año 2012 se presentaron 3.45 millones de casos de cancer nuevos y 1.75 millones de muertes por esta patología, donde el tipo más frecuente fue el cáncer de seno (464.000 casos), el cual fue la tercero en mortalidad (131,000 casos)(2). En este continente se observa una incidencia de esta patología de 73.3 casos por cada 100.000(3). En contraste, en países en vía de desarrollo, en una ciudad como Santiago de Cali (Colombia), la tasa de incidencia para cáncer de mama en mujeres durante el periodo del 2001-2005 fue de 46.8 por 100.000 mujeres al año según el registro poblacional del cáncer de Cali (RPCC) y publicado por IARC.

El cáncer de mama es considerado un problema sanitario y social de primer orden. Donde aproximadamente la mitad de las pacientes con cáncer de mama localizado y tratadas con cirugía radical sufrirán una recidiva. Las metástasis y la invasión son la principal causa de morbi-mortalidad relacionada con el cáncer de mama y el poder desarrollar técnicas moleculares que permitan la detección precoz de las metástasis axilares ha sido el objetivo de muchas investigaciones.

Antes de haber desarrollado la técnica quirúrgica del ganglio centinela, el tratamiento del cáncer de mama incluía la disección axilar completa para la determinación de las metástasis axilares. En la actualidad las metástasis linfáticas continúan siendo el factor predictivo más importante y los estudios en la técnica del ganglio centinela han permitido avanzar en su detección y en llevar un control loco-regional adecuado. El estudio anatomopatológico de los ganglios linfáticos

posterior a una disección axilar completa, donde se realizaban dos o tres cortes de cada ganglio y se teñían con hematoxilina y eosina (H&E), fue un procedimiento rutinario que no permitía el estudio exhaustivo de todos los ganglios y dirigía los esfuerzos diagnósticos a uno o dos de ellos específicamente. (4)

El ganglio centinela es definido como el primer ganglio de drenaje de la mama, el cual se detecta con técnicas de medicina nuclear y/o colorante. Poder hacer esta determinación disminuye la morbilidad de una linfadenectomía axilar completa y ha revolucionado el tratamiento del cáncer de mama en la última década. (5)

También se ha establecido cuales son las pacientes candidatas a la técnica, mujeres con diagnóstico de cáncer de mama en estadios I y II, básicamente tumores menores de 3 cm y sin compromiso axilar al examen clínico. El estudio del ganglio centinela ha permitido disminuir las linfadenectomías aproximadamente en un 60% en estos estadios. (6)

El advenimiento de nuevas técnicas en Patología Molecular como la inmunohistoquímica (IHQ), han aumentado la sensibilidad en la detección de las micrometástasis en un 10 al 20%, frente a la coloración de H&E. (7)(4)

La técnica molecular de reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (RT-PCR), ha incrementado de un 84% a un 93% la sensibilidad, y de un 95 a un 98% la especificidad comparada con la H&E e IHQ (8). En casos donde se han empleado como marcadores moleculares diferentes proteínas como HER2(9), entre los marcadores evaluados se encuentra la expresión de la Citoqueratina 19 (CK19), la cual se ha empleado marcador en células tumorales empleando inmunocitoquímica (10), encontrándose expresado células tumorales circulantes (11) y líneas celulares de cáncer de mama por RT-PCR (12–14), permitiendo diferenciales de células normales; esta expresión diferencial de CK19 se ha observado en otras patologías como cáncer de pulmón (15) y neoplasia endocrina pancreática(16). Este tipo de marcadores podrían ser empleados en la detección del tumor de mama en estadios precoces, donde es curable. Porque le el objetivo

de esta investigación fue desarrollar la metodología y técnica molecular requerida para el estudio de biopsias de ganglios centinela, en cáncer de mama estadios temprano (hasta 3 cm), mediante la expresión de los genes Mamaglobina y Citoqueratina 19 (CK-19) por RT-PCR y qPCR, así como su validez diagnóstica sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) comparándolas con las pruebas *Gold estándar* coloración de Hematoxilina y eosina (H&E) y la combinación H&E+IHQ (inmunohistoquímica).

2.1 EVOLUCIÓN Y CONCEPTOS GENERALES EN EL MANEJO Y DIAGNOSTICO DEL CANCER DE MAMA

2.1.2. Reseña histórica

La primera referencia sobre el cáncer de mama se encuentra en el papiro de Smith (año 3000-2500 a.c). (17) Hipócrates (460-370 a.c) fue el primero en describir las características que diferenciaban entre los tumores benignos y malignos, pero la primera descripción detallada de una mastectomía la realizó el griego Leónidas, de la escuela de Alejandría (siglo I a.c), quien explicaba la técnica realizada por los siguientes 1500 años.

Galeno (año 131-201 d.c) atribuía la enfermedad como una manifestación local de la "melancolía", causada por el exceso de bilis negra en el cuerpo y recomendaba la extirpación completa de la glándula mamaria. Siendo así Galeno el primero en describir en la historia una cirugía para el tratamiento del cáncer.

El padre de la cirugía francesa el Dr. Lanfranc (año 1296), popularizó la mastectomía en las escuelas europeas. En esta época los tumores mamarios se diagnosticaban es estadios muy avanzados, con ulceración y afectación ganglionar extensa.

En el renacimiento se emplearon métodos muy agresivos y mutilantes durante la

cirugía. En el siglo XVI y XVII se diseñaron instrumentos para comprimir la base de la mama, con el fin de facilitar su amputación y se describieron múltiples técnicas quirúrgicas. En el siglo XVII y hasta el XIX, se desarrollaron los principios técnicos de la mastectomía y el vaciamiento axilar. Richard Von Wolkman en Alemania (año 1865) propuso la resección amplia de la mama, con piel, fascia y músculo. Sir Charles Moore en Londres (año 1867) describió la técnica de la mastectomía radical, apoyándose en conceptos de importantes cirujanos como Joseph Lister y Samuel Gross.(18,19)

Por esta época se desarrollaba la anestesia, la antisepsia y el microscopio. Así nacía la patología celular, se describió el comportamiento las células malignas y el origen en los epitelios; esto fue fundamental para aplicar la histología tumoral, en la cirugía de mama.

La primera mastectomía radical fue realizada por J. Lister, en Glasgow en el año 1867. La evolución de la cirugía de mama como un método estandarizado, efectivo y mundialmente aceptado para el tratamiento del cáncer de mama, se le debe a William S. Halsted considerado el fundador de la cirugía moderna y cuyos fundamentos permanecieron vigentes hasta finales del siglo XX.(20)

Considerado el pionero de la cirugía en el cáncer de mama (año 1882), Halsted inició la práctica rutinaria de la mastectomía radical, técnica que por primera vez mejoró de forma significativa la supervivencia de las pacientes y el control de la enfermedad, aun cuando la supervivencia a 10 años era del 10%, debido a que los tumores se encontraban en estadios muy avanzados.

La mastectomía radical fue conocida como el prototipo de cirugía oncológica, en donde lo esencial era la extirpación amplia del tejido afectado por el tumor y áreas sospechosas. La resección de los ganglios axilares durante el procedimiento, se basaba en el concepto de que la diseminación del cáncer de mama ocurría de forma escalonada, primero los ganglios axilares y posterior la circulación

sistémica.

Con la implementación de la mastectomía radical en 1894, se elevó la supervivencia a 5 años del 4% al 29%, por lo que era el tratamiento preferido hasta pasada la mitad del siglo XX.

En 1963, Auchincloss en Nueva York, describió una modificación de la mastectomía radical modificada de Patey-Handley, que consiste en una mastectomía simple, con disección axilar de los niveles inferiores de la axila respetando el ápice, la grasa circundante, los vasos axilares y los músculos pectorales. Esta técnica conocida como Patey y Auchincloss es la que se emplea actualmente para los tumores avanzados.

En 1992 Bernard Fisher del National Cancer Institute, concluye en sus estudios que las pacientes podrían ser tratadas de forma segura con cirugía conservadora de mama y radioterapia. Esto cambió totalmente la forma de tratar el cáncer de mama vigente por más de 100 años.(21)

En la década de los 70' se empezó a utilizar la quimioterapia en pacientes con cáncer de mama metastásico y poco a poco se empezaron a ver resultados favorables en cuanto a la supervivencia, esta era conocida como quimioterapia paliativa.

Después se utilizaron otros agentes quimioterapéuticos en diferentes estadios tumorales, en casos de enfermedad temprana se utilizaba post-operatoria, conocida como quimioterapia adyuvante y en caso de tumores avanzados, la quimioterapia se utilizaba preoperatoria, conocida como quimioterapia neoadyuvante, las cuales aun están vigentes.(21–23)

La hormonoterapia se ha utilizado por más de 100 años, inicialmente con la ooforectomía de las pacientes con cáncer metastásico. Aunque ahora se utilizan

sustancias que logran la castración farmacológica(24).

Al lograr identificar la expresión de receptores de estrógenos y progesterona con la IHQ en las células mamarias, se ha podido realizar la manipulación hormonal en las pacientes con cáncer de mama.(25)

2.1.2. Concepto del ganglio centinela

La técnica quirúrgica actual tiende a conservar el tejido mamario sano, realizando resecciones con márgenes oncológicos seguros. La cirugía conservadora es una técnica de uso mundial, en especial en países con buen *screening* mamográfico; esto permite detectar tumores cada vez más pequeños y susceptibles de un tratamiento conservador. Se busca realizar solo el vaciamiento axilar en aquellos casos estrictamente necesarios.

La técnica del ganglio centinela se basa en su detección a través de colorantes y/o radioisótopos, permitiendo la extracción y análisis en busca de metástasis. En caso de ser negativo la metástasis de cáncer de mama, evita la linfadenectomía axilar completa, la cual estima se aplica a aproximadamente al 30% de las pacientes con la patología en estados avanzados.(26–29) (15-18)

Otro aspecto quirúrgico actual, es que posterior a la mastectomía se puede ofrecer una reconstrucción inmediata en el mismo acto quirúrgico, permitiendo disminuir el impacto psicológico, social y económico al que se enfrenta la mujer con cáncer de mama. (30,31)

En tumores tempranos las incisiones son cada vez más pequeñas, el objetivo es realizar mastectomía con preservación de la piel sana, lo que no afecta en mayor grado la recurrencia local.

La radioterapia es utilizada en todos los casos de cirugía conservadora y después

de la mastectomía radical modificada en caso de que el tumor sea mayor de 5 cm, con más de 4 ganglios linfáticos positivos para metástasis, márgenes de resección comprometidos o cercanos al tumor (menor de 5 mm), siendo la braquiterapia una técnica utilizada con éxito, la cual consiste en radiación localizada.(32–34)

La quimioterapia se limitaba a las pacientes con ganglios linfáticos positivos, pero se amplió su uso a la mayoría de tumores y hoy se indica en tumores mayores de 1 cm.(35,36)

Las investigaciones actuales buscan personalizar los tratamientos, de este modo se quiere aumentar la selección de las pacientes y caracterizar genéticamente cada tumor. (37)(26)

2.1.3. Exploración física

Los hallazgos clínicos de sospecha incluyen cualquier irregularidad o masa, aumento del tamaño de la mama, cambios en la piel (edema, eritema, retracción o ulceración), asimetrías en el contorno de la mama, eczema, drenaje hemático por el pezón o tumoración axilar entre otros.

El examen clínico de las mamas por profesionales, el estudio radiológico con mamografía y ecografías son los principales métodos de vigilancia del cáncer de mama. En las mujeres jóvenes el examen físico y la ecografía son cruciales para su estudio, ya que la mamografía es de difícil interpretación, debido a la densidad de la mama.

2.1.4 Técnicas radiológicas

Uno de los mayores avances en el diagnóstico del cáncer de mama es su detección precoz, en lo que la mamografía ha sido fundamental como método de screening. Gracias a estudios realizados desde 1960 como el HIP (Health Insurance Plan of New York Trial), sabemos que la mamografía reduce en un 30%

la mortalidad del cáncer de mama. Si la mama es densa o la edad de la paciente es menor, la sensibilidad de esta es menor.

Ahora contamos con técnicas de imagen que ayudan a mejorar el diagnóstico como son la mamografía digital, la resonancia magnética nuclear y los ultrasonidos de última generación.

2.1.4.1. Mamografía

Es el principal método diagnóstico para la detección del cáncer de mama por su alta sensibilidad entre el 70% al 90%, aunque la especificidad varia de un 40% al 75%.

Cuando se suma el examen físico que detecta entre un 18% al 25% del cáncer de mama, con la mamografía que detecta entre un 80% a un 85%, combinadas detectan entre un 90% a 95% de los tumores.

El análisis mamográfico incluye la detección de nódulos, masas, alteraciones estructurales, calcificaciones, microcalcificaciones, asimetrías en el tejido, alteraciones en la piel y en el pezón. Las lesiones detectadas se clasifican en diversas categorías pronosticas (normal, benigno, probablemente benigno, probablemente maligna y maligna) utilizado con el fin de protocolizar el seguimiento y terapia. El método utilizado para clasificar las lesiones es el llamado BI-RADS (Breast Imagina and Reporting And Data Base System). (**Tabla 1**)

Se diagnostican tumores en estadio muy temprano por mamografía, al encontrar microcalcificaciones sin masa, las cuales se resecan vía quirúrgica o estereotáxica.

La mamografía digital tiene la ventaja de detectar cáncer de mama en mujeres menores de 50 años, pre o peri menopáusicas, en mujeres con mamas heterogéneas y densas como se ha comprobado en los diversos estudios. (38,39)

Tabla 1. Categorías BI-RADS

Categoría	Definición
0	Evaluación incompleta, se necesitan otras técnicas de imagen y/o mamografías previas para comparar.
1	Negativo
2	Hallazgos benignos (VPP de 0% para cáncer)
3	Probablemente benigno, pero se sugiere seguimiento a corto plazo (VPP menor del 2%) Equivale a: Nódulo bien definido, no calcificado, con asimetría focal y agrupación de microcalcificaciones.
4	Sospechoso (VPP del 30%)
5	Altamente indicativo de malignidad (VPP del 95%)
6	Cancer ya conocido histológicamente antes de iniciar el tratamiento

2.1.4.2 Ecografía

La ecografía ha sido el complemento diagnóstico para diferenciar entre una lesión sólida o quística, para el seguimiento de nódulos quísticos y para evaluar mamas densas, embarazadas y menores de 40 años.

El desarrollo de transductores lineales de alta frecuencia han mejorado la resolución espacial y esto permite detectar lesiones menores de 1 cm. Tiene la ventaja de no utilizar radiaciones ionizantes, poder ser usada para realizar biopsias y punciones guiadas con seguridad.

Pero esta técnica no está aceptada para el cribado del cáncer de mama por su baja sensibilidad en la detección de tumores, no visualiza las microcalcificaciones del carcinoma ductal *in-situ* y algunas masas pueden pasar inadvertidas, por no

diferenciarse del tejido fibroglandular isoecoico adyacente.

Es una técnica que permite detectar y puncionar adenopatías y valorar el volumen tumoral en la respuesta a la quimioterapia neoadyuvante y puede ser útil para diferenciar cambios postquirúrgicos de recurrencia tumoral.

El doppler color en los tumores sospechosos muestra hipevascularidad en un 92%, vasos irregulares en un 54%, además de más de un polo vascular. Y es poco útil en tumores *in-situ* y menores de 9 mm.(40)

El *Power Doppler* tiene una sensibilidad y especificidad del 74%, este es útil en tumores menores de 5 mm.(41)

La ecografía tridimensional ofrece imágenes de gran calidad, sobretudo en el plano coronal, pero aun no hay evidencia de que mejore la capacidad diagnóstica. (42)

2.1.4.3. Resonancia magnética nuclear

Esta técnica de imagen ayuda a diferenciar lesiones indeterminadas o zonas cicatrízales confusas en la mamografía. Es útil para evaluar a las pacientes con prótesis mamaria y ayuda a detectar focos multicéntricos o multifocales y valorar la extensión de la lesión. Todo esto permitiendo una mejor estadificación y planificación del tratamiento.(43,44) (33,34)

2.1.4.4. Tomografía por emisión de positrones (PET/SCAN)

Se utiliza la tomografía por emisión de positrones acoplándole la tomografía computarizada helicoidal multiplanar. Esta técnica tiene su mejor aplicabilidad en los estudios de extensión tumoral a distancia, especialmente en busca de metástasis ganglionares mediastínicas y ganglios localizados en la mamaria interna. Valora de forma adecuada lesiones hepáticas y lesiones óseas, pero es

insuficiente en las lesiones osteoblásticas, por lo que no reemplaza la gammagrafía. También tiene impacto en el seguimiento terapéutico.(45)

2.1.4.5. Estudio anatomopatológico del cáncer de mama

El estudio histológico incluye parámetros que han sido establecidos como pronóstico y que son importantes en la determinación terapéutica y en la supervivencia de las pacientes con cáncer de mama. Los factores pronóstico más importantes son: el tamaño tumoral, el tipo histológico, el grado de diferenciación, los receptores de estrógeno y progesterona, el oncogén HER-2 y el índice de proliferación celular Ki-67.

En tumores con tamaños menores de 1 cm, se puede encontrar metástasis ganglionares en un 26%, mientras que un tumor de 10 cm el 80% tiene metástasis ganglionares. El bajo grado de diferenciación tumoral y el tipo histológico tubular, mucinoso o adenoide implica un mejor pronóstico. A continuación presentamos la clasificación de los distintos tipos histológicos en cáncer de mama. (**Tabla 2**)

Los tumores con receptores hormonales positivos tienen mejor pronóstico, por su mejor respuesta al tratamiento hormonal y en el caso del oncogén HER-2 al ser positivo son susceptibles de tratamiento con Trastuzumab. El antígeno Ki-67 permite valorar su proliferación y se puede correlacionar con el grado de diferenciación, la invasión vascular y la metástasis en los ganglios axilares.

Los tumores mamarios que más predominan son los de tipo epitelial, en frecuencia, el tipo ductal y lobulillar, seguidos del coloide, papilar y medular. En los últimos 10 años es más frecuente diagnosticar carcinomas *in-situ* como el carcinoma intraductal (DCIS), solos o asociados a carcinoma infiltrante, esto debido a las campañas de diagnóstico precoz. El carcinoma lobulillar *in situ*, no se considera un verdadero tumor, se evalúa más en el contexto del riesgo para desarrollar cáncer invasivo en cualquiera de las dos mamas.

Tabla 2. Clasificación histológica del cáncer de mama

Tumores epiteliales:

1. Carcinoma Lobulillar.

- No infiltrante (in situ)
- Infiltrante:

Variantes: tubulolobulillar, alveolar, sólido y pleomórfico

2. Carcinoma Ductal.

- No infiltrante (intraductal o *in-situ*)

Variantes: cribiforme, sólido, comedocarcinoma, papilar, micropapilar y clinging

Variantes infrecuentes: con células apocrinas, claras y anillo de sello

- **Infiltrante**

Variantes: tubular, medular, papilar, mucinoso, micropapilar y cribiforme

3. Carcinoma de variantes especiales.

- **Metaplásico:**

Carcinoma escamoso de origen ductal

Adenocarcinoma con diferenciación escamosa

Adenocarcinoma con metaplasia de células fusiformes

Adenocarcinoma con metaplasia condroide

Carcinoma con diferenciación ósea

- **Apocrino**
 - **Histiocitoide**
 - **Rico en lípidos**
 - **Con células en anillo de sello**
 - **Secretor**
 - **Rico en glucógeno**
 - **Con células gigantes "osteoclásticas"**
-

-
- **Con rasgos coriocarcinomatosos**
 - **Adenoide quístico**
 - **Con diferenciación neuroendocrina (carcinoide)**

4. Carcinoma mixto ductal y lobulillar.

5. Enfermedad de Paget (con carcinoma subyacente o sin él)

Tumores mesenquimales malignos:

- **Fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, liposarcoma, leiomiosarcoma, rabdomiosarcoma y angiosarcoma entre los más comunes**

Tumores mioepiteliales malignos

Tumor filodes maligno

Linfomas

Carcinosarcoma

2.1.4.6 Evolución en el manejo del cáncer de mama

El cáncer de mama es la neoplasia maligna más investigada y con más combinaciones terapéuticas, esto debido a su alta frecuencia en las mujeres occidentales.

Los avances en la terapéutica se enfoca en:

- Utilizar técnicas mínimamente invasivas para predecir la respuesta al tratamiento y pronóstico
- La técnica quirúrgica es cada vez más conservadora
- El diagnóstico temprano de las lesiones
- El uso selectivo de la linfadenectomía

- La radioterapia de forma selectiva posterior a la cuadrantectomía o tumorectomía
- La quimioterapia en tumores invasores
- El desarrollo de marcadores pronóstico propios del tumor, que puedan guiar las terapias sistémicas
- El desarrollo de nuevos fármacos para adyuvancia sistémica (hormonoterapia)
- Medidas profilácticas en pacientes de alto riesgo
- Consejo genético en familias portadoras de cáncer de mama

Poder disminuir la agresividad en el tratamiento no solo se enfoca actualmente en la cirugía, sino también en los tratamientos. Muchas mujeres reciben quimioterapias post-quirúrgica sin efectos positivos sobre el tumor y con grandes efectos secundarios.

El objetivo en las investigaciones actuales es seleccionar a los grupos en los cuales más se beneficien de los tratamientos y en algunas otras se les obvie el tratamiento. Esta evolución se logra con los estudios de la evaluación in vivo de la respuesta tumoral al tratamiento, el estudio del análisis genético y la detección de micrometástasis en ganglio centinela y medula ósea. El futuro es prometedor y seguramente todo lo que hacemos y sabemos del cáncer de mama cambiará de manera importante en la próxima década.

2.2. EPIDEMIOLOGÍA

El cáncer de mama es considerado un problema mundial de salud.

2.2.1. Incidencia

Se calcula que el cáncer de mama afecta a lo largo de la vida a 1 de cada 8 mujeres en los Estados Unidos y a 1 de cada 12 mujeres en España, por lo que constituye un problema sanitario y social de primer orden en el mundo occidental.

Cerca de 175.000 nuevos casos son diagnosticados en Estados Unidos, mientras en España se diagnostican entre 15.000 a 20.000 nuevos casos, con 6.000 a 7.000 fallecimientos anuales por la enfermedad.

Es el tumor más frecuente y la primera causa de muerte por cáncer en la mujer en Estados Unidos y España, además representa el 34% de los casos nuevos de cáncer en España. Estos datos ponen de manifiesto que el cáncer de mama representa un problema de salud pública.(46,47)

A lo largo de la vida se incrementa la incidencia con rapidez hasta los 50 años (riesgo acumulado de 8.8% a 9.1%) y posterior este incremento disminuye al alcanzar una edad de 74 años (5%).

Al revisar la incidencia del cáncer de mama en España, se observa una disminución de esta situación que no corresponde a la evolución que se observa en el mundo y que se explica por la gran variabilidad de registros del cáncer con los que se cuenta. Para la organización mundial de la salud (OMS) la tasa estandarizada fue de 61.4 y 49.63 casos por 100.000 mujeres para los años 1995 y 1998 respectivamente. Para España en el año 2000 se estimó 47.87 casos por 100.000 mujeres.

En España alrededor de 15.000 mujeres son diagnosticadas cada año, de estas el 70% de los casos son menores de 1 cm y sin afectación axilar. Así mismo el número de carcinomas *in-situ* representa entre el 20% y 25% de todos los tumores observados en los centros con unidades mamarias.

Observamos que la incidencia es mayor en los países desarrollados donde es hasta 6 veces más alta que en los países en desarrollo como Colombia, donde

paso del quinto al segundo lugar en frecuencia, según información del Registro Poblacional del Cancer de Cali. (**Tabla 3**)

Tabla 3. Cali, Colombia. Tasas de incidencia del cáncer de mama específica por edad, cruda y ajustada por edad durante el periodo de 1962-2008

MUJERES

Periodo	30-34	35-39	40-44	45-49	50-54	55-59	60-64	65-69	70-74	75-79	80-84	85	n	TC	TEE
1962-1966	9.4	25	48.2	66.1	79.8	93.5	79.6	96	114.1	121.9	98.9	20	257	15.7	27.1
1967-1971	10.2	24.6	52.6	67.1	74	68	67.2	116.5	98.7	163.1	0	0	325	16	27.3
1972-1976	14	26.9	49.1	67.8	85.2	102.2	117.5	136	94	169.6	0	0	492	20.1	33.2
1977-1981	10.4	27	44	74.3	88.5	91.7	131.6	134.7	150.8	158	205.1	178.9	614	20.5	34.8
1982-1986	15.8	31.3	56.3	80.6	91.6	101.4	112.4	130.5	131.8	150.9	157.1	89	853	24.3	34.8
1987-1991	17.4	27.6	64.5	81	90.7	98.9	123.4	144.7	169.2	173.1	138.4	165.3	1151	29.4	38.8
1992-1996	12	27.4	56.1	97.8	83.2	113.9	124.9	123.1	175.7	150.8	149.1	129.7	1306	29.6	37.3
1998-2002	20.2	34.1	76.5	101	116.4	142.1	162.8	184.8	205.3	195.2	224.3	223.4	2139	44	47.5
2003-2007	17.3	40.2	66.9	105.3	119.5	165.9	182.3	186.1	183.9	191.7	188	306.2	2667	49.6	48
2004-2008	17.8	39	63.8	107	121.4	170	179.9	183.7	193.7	193.1	170.7	326.4	2809	51.1	48.3

Donde:n= número de casos; TC Tasa cruda; TEE Tasas estandarizadas por edad por 100.000 personas-año. (Población estándar mundial)

2.2.2. Mortalidad

La mortalidad en Europa para 1990-1992 vario entre 15/100.000 mujeres en los países del sur y de 29/100.000 en los países del norte. Representa el 19% de las muertes en mujeres por cáncer y equivale a 1/3 de las recurrencias tumorales. (**Tabla 4**).

Aunque la mortalidad en los países desarrollados esta en descenso gracias a los avances en el tratamiento y la instauración de programas organizados de tamizaje, esta situación difiere en países Latinoamericanos como Colombia, donde la tendencia es a un incremento en la mortalidad, como se observa en Cali según información del Registro Poblacional del Cancer (**Tabla 5**). El 40.7% de los tumores de mama que se diagnostican en Colombia se encuentra en estado avanzado según informes del Instituto Nacional de Cancerología.

Tabla 4. Numero de fallecidas por año de cáncer de mama en España.

Mortalidad por cáncer de mama en España	Total
Año	
1980	3.629
1981	3.644
1982	3.904
1983	3.975
1984	4.231
1985	4.293
1986	4.561
1987	4.895
1988	5.134
1989	5.287
1990	5.398
1991	5.462
1992	5.624
1993	5.902
1994	5.864
1995	6.026

Tabla 5. Cali, Colombia. Tasas de mortalidad por cáncer de mama especificada por edad, cruda y ajustada por edad durante el periodo de 1984-2012

Periodo	30-34	35-39	40-44	45-49	50-54	55-59	60-64	65-69	70-74	75-79	80-84	85	n	TC	TEE
1984-1988	2.1	10	11	19.9	30	39	58.1	39.9	52.8	77.7	84.5	70.2	298	8.3	11.9
1989-1993	4.3	9.6	22.8	25.4	38.4	47.8	46.4	61.7	63	115.1	114.6	75.2	460	11.3	14.7
1994-1998	2.7	9.2	18.7	24.8	35.3	40.3	49.9	62.7	71.8	76.2	102.5	114.3	529	11.7	14
1999-2003	4.9	9.2	20.4	35.6	42.2	47.5	60.3	63.9	65.7	82.6	112	173.2	763	15.4	16.2
2004-2008	2.9	9.1	13.7	24.1	35.5	45	49	55.5	58.8	92.7	109.8	150.2	813	14.8	13.7
2008-2012	4.4	7.4	12.3	20.7	34.8	48.9	52.2	58.4	61.3	70.4	98.6	160.8	933	15.9	13.8

Donde: n= número de casos; TC Tasa cruda; TEE Tasas estandarizadas por edad por 100.000 personas-año (Población estándar mundial)

2.2.3. Tendencia actual

La incidencia y mortalidad del cáncer de mama se está incrementados durante este siglo en todo el mundo. Se cree que puede ser debido a cambios durante la gestación y cambios nutricionales.

En las dos últimas décadas y a partir de 1990 parece que la mortalidad se detiene e incluso disminuye, esto debido a la implementación de la mamografía, los programas de detección precoz y a la mejoría en la terapéutica y pronóstico de estas pacientes.

El hecho de que las cifras de incidencia sean iguales en las poblaciones emigrantes en una o dos generaciones, habla a favor de que los factores culturales, dietéticos y ambientales, son fundamentales, más que los étnicos o de origen (48). La incidencia según poblaciones de riesgo es inversa a la del cáncer de cérvix, lo que dificulta efectuar programas de screening conjuntos. (**Tabla 6**)

Tabla 6. Diferencias entre el cáncer de mama y de cérvix

Diferencia entre el cáncer de cérvix y mama	Cervix	Mama
Edad	Joven	Madura
Estrato social	Bajo	Alto
Estado civil	Casada	Soltera/sin hijos
Sexualidad	Muy Activa	Activa
Paridad	Riesgo	Protección
Comportamiento sexual	Promiscua	No promiscua
Ingresos	Bajos	Altos
Dieta	Deficiente	Suficiente
Fenotipo	Delgada	Obesa
Biología	No hormonal	Hormonal
Detección	Fácil	Difícil
Metodología diagnóstico	Sencilla	Compleja
Pesquisa	Itinerante	Centros fijos
Costos	Bajos	Altos
Prevención	Posible (vacuna)	No posible
Bases	Citología	Ex clínico/mamografía
Rendimiento	Alto	Variable

2.3. FACTORES DE RIESGO

En la actualidad se considera el cáncer como una enfermedad genética, resultante de la acumulación de alteraciones moleculares en genes que participan en el control del crecimiento celular.

La carcinogénesis es un proceso complejo en el que están implicados al menos dos tipos de sustancias o agentes, unas que inducen alteraciones genéticas o iniciadores (en la mayoría de los casos mutágenos como radiaciones o agentes químicos) y otras consideradas como promotores tumorales, cuyo papel parece consistir en aumentar la proliferación celular (factores de crecimiento y hormonas).

Los factores de riesgo no son equivalentes a causalidad y por si mismos no son suficientes para que aparezca el cáncer de mama. La incidencia y la mortalidad del cáncer de mama, varía según la ubicación geográfica, esto sugiere que el riesgo de padecerlo está determinado por los factores ambientales y el estilo de vida. (**Tabla 7**)

Sexo: La incidencia del cáncer de mama en hombres es muy baja, se encuentra en un varón por cada 100 mujeres que son portadoras de cáncer de mama. (49)(39)

Edad: El 90% de los tumores aparecen pasados los 40 años, con edades máximas de 85 años. Sin embargo el 1.2% de los casos se diagnostican en menores de 30 años, asociado muy frecuentemente a mutaciones en los genes BRCA 1 o BRCA 2. La frecuencia se incrementa y alcanza una meseta entre los 45 a 55 años. El riesgo de desarrollar el cáncer de mama en edades de 80 a 85 años es el doble de las mujeres de 60 a 65 años.

Factores étnicos: Determinadas razas entre ellas la judía, tienen mayor riesgo de padecer cáncer de mama, independiente de otros factores.

Historia familiar: Es un factor importante cuando dos o más familiares de primer grado sufrieron la enfermedad. Se ha observado que si la madre o hermana han padecido cáncer de mama bilateral antes de los 50 años, se tiene un riesgo de más de un 50% de sufrir la enfermedad, esto se puede atribuir también a factores ambientales compartidos.

El 5% de los tumores mamarios corresponden a alguna alteración genética, la presencia de los genes BRCA-1 y/o BRCA-2 determina un riesgo del 50% al 85% al referirnos al cáncer de mama y de un 15% al 40% al referirnos al cáncer de ovario, esto según la penetración del gen.

Antecedentes de cáncer: Cuando una mujer ha tenido ya un cáncer de mama, el riesgo de tener otro contra lateral, aumenta 5 veces más que en el resto de la población. El carcinoma lobulillar presenta de 8 a 10 veces más riesgo de aparecer en la otra mama de forma simétrica. Usualmente el haber tenido otros tumores sólidos como ovario, endometrio o colon implica una mayor incidencia de otros tumores.

Patología mamaria benigna: El fibroadenoma es una lesión de mujeres jóvenes y no aumenta el riesgo de que aparezca un cáncer de mama posterior. Pero si el fibroadenoma se asocia a hiperplasia epitelial, se ha cuestionado si podría ser precursor de lesiones malignas. En un estudio de 1.835 pacientes se demostró que el fibroadenoma llamado complejo, es un factor de riesgo de cáncer de mama a largo plazo. (50)

Las hiperplasias atípicas son las lesiones que incrementan el riesgo de desarrollar más tarde cáncer de mama, con un RR (riesgo relativo) que varía según las series publicadas, pero que siempre es significativo. Este riesgo es más importante en las mujeres pre menopáusicas y algunos consideran que el antecedente familiar podría ser significativo. En caso de hiperplasia atípica el RR es de 3.7, si la mujer es pre menopáusica el RR es de 5.9 y si tiene antecedentes familiares el RR se incrementa hasta 7.3. (49)

Menarquía precoz: Se considera que las mujeres que menstrúan antes de los 12 años y con precocidad en la ovulación (menos de un año antes de la menarquía) tienen mayor riesgo de tener cáncer de mama pre menopáusico. Cuanto más

temprana es la edad de la menarquía es mayor el riesgo y parece claro el efecto de la menarquía tardía como un factor protector. La explicación de esto aun es discutida, pero tiene relación con los ciclos ovulatorios. (51)

Menopausia tardía: Considerada después de los 50 años. Una mujer con la menopausia natural antes de los 45 años tiene la mitad de riesgo que una de su misma edad con menopausia a los 55 años. Por cada 5 años de diferencia en la edad de la menopausia el riesgo del cáncer de mama se incrementa en un 17%. Parece ser que la ooforectomía antes de los 40 años reduce alrededor de un 75% el riesgo de padecer cáncer de mama. No se ha podido demostrar que la edad de la menarquía y la edad de la menopausia compartan un mismo factor causal.(52,53)

Edad del primer embarazo a término: Esta edad de protección corresponde a tener un embarazo a término antes de los 25 años. Algunos autores consideran que tener el primer hijo antes de los 20 años supone una caída del riesgo en un 50%, en relación con las nulíparas. El embarazo actuaría como factor protector con aumento de la globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG) y descenso de la prolactina. En cuanto al número de hijos no está claro que sea un factor protector, pero de serlo sería con más de 4 o 5 hijos. (54). Tener el primer hijo después de los 35 años parece que aumenta el riesgo tres veces más. La nuliparidad también está asociada a un mayor riesgo, mientras que la esterilidad podría ser un factor protector.

Lactancia materna: No está claro que proteja, pero de hacerlo solo tendría influencia en las pre menopáusicas. Hoy en día no parece que exista un valor protector como se creía.

Radiaciones ionizantes: Su efecto es directamente proporcional a la dosis e inversamente proporcional a la edad, permaneciendo de por vida. Por encima de los 40 años el riesgo se reduce notablemente. Lo importante a considerar es la

edad (10-19 años), en la cual la paciente es irradiada.

Obesidad: En mujeres jóvenes y postmenopáusicas con acumulo de grasa abdominal y visceral y dietas ricas en grasas animales y carnes, el riesgo se ha visto incrementado. En el cáncer de mujeres postmenopáusicas se alteran los ciclos menstruales y la secreción de progesterona, empeorando su pronóstico. Es posible que el tamaño de la mama tenga mayor valor predictivo de riesgo que la relación peso/talla.(55)(46)

Tratamientos hormonales

Anticonceptivos hormonales: La utilización de estos entre los 25 a 39 años parece no ser un factor de riesgo. Se ha observado que en mujeres con cáncer de mama la toma de anovulatorios puede acelerar el crecimiento tumoral.(56,57)

Terapia sustitutiva con estrógenos en peri menopáusicas: Parece ser que el riesgo se incrementa solo en aquellas con patología mamaria previa. Cuando se asocia a progestágenos disminuye el riesgo. Aunque la toma de más 7 años parece implicar un riesgo, no existen datos concluyentes sobre el riesgo-beneficio en las pacientes con cáncer de mama.(56,57)

Niveles elevados de estrógenos y testosterona en mujeres postmenopáusicas: Se asocia a un mayor riesgo de cáncer de mama. (56,57)

Alcohol: El riesgo se incrementa proporcional a su consumo ya la edad de inicio del consumo, según estudios epidemiológicos de la Universidad de Oxford.

Factores dietéticos: El cáncer de mama se ha incrementado en países anglosajones y de estratos sociales altos, lo que hace pensar que las costumbres

y forma de vida de estas mujeres se asocien al cáncer de mama. Las dietas ricas en grasas animales están directamente asociadas con la obesidad y con niveles altos de colesterol. Esto relacionado a una mayor producción de estrógenos por vía suprarrenal y por tanto aparición de neoplasia maligna. Se recomiendan dietas mediterráneas, con poca grasa y menos de 2.000 calorías, como también el consumo de frutas, verduras, ácidos grasos insaturados y micronutrientes, que podrían disminuir el riesgo según publicación de la American Journal of Clinical Nutrition.(58)

Ejercicio moderado y continuo: Ejercitarse reduce el riesgo del cáncer de mama, según estudios llevados en el Centro de Investigación del Cancer Fred Hutchinson, en Seattle, Estados Unidos. El estudio es basado en 74.000 casos, la investigación encontró que las mujeres más activas reducían el riesgo de desarrollar la enfermedad en un 20%.(59)

Tabaco: No se asocia directamente con el aumento del cáncer de mama. Algunos estudios si lo asocian a mayor riesgo, pero está claro que los carcinógenos ambientales y de la combustión del tabaco se encuentran en los tejidos mamarios tumorales. Además el tabaco en las mujeres fumadoras altera el metabolismo de los estrógenos y adelanta la menopausia según publicaciones del Journal of the National Cancer Institute de Estados Unidos.(60)

Estrés: Aun no está aclarado, pero en distintas situaciones familiares (divorcio, muerte de un familiar etc.) no parece existir ninguna relación o en situaciones de estrés moderado. Algunos estudios como el realizado en Ben-Gurion University del Negev in Berr Sheva consideran que el estrés intenso si podría influir y tener relevancia a la hora de desarrollar la enfermedad.(61)

Riesgos histológicos: En los hallazgos histológicos de displasias estas tienen riesgo de evolucionar hacia el carcinoma in situ, especialmente en aquellas con proliferación. Las pacientes con hiperplasias sin atipia tienen un riesgo relativo de 1 a 2, en tanto que en las hiperplasias con atipia el RR se incrementa de 6 a 8, lo

cual es para ambas mamas.

Las pacientes que no son tratadas de los carcinomas in situ, un tercio de ellas evolucionan a carcinomas invasores en un lapso de 10 a 18 años del diagnóstico.

Si el carcinoma in situ es lobulillar, del 15% al 20% desarrollaran un cáncer de mama en esa mama y del 10 % al 15% lo desarrollaran en la mama contra lateral.

Cuando se ha padecido cáncer de mama invasivo en una mama, el riesgo de desarrollar cáncer en la mama contra lateral es de 0.5% a 1% anual, manteniéndose constante durante dos años según publicaciones del Journal of the National Cancer Institute de Estados Unidos.

Tabla 7. Factores de riesgo en cáncer de mama

Cáncer de mama y factores de riesgo	Riesgo relativo (RR)
Historia familiar	
Primer grado y menor de 49 años	3.1 padecido por la madre y
Madre o hermana mayor de 50 años	hermana 1.4
Unilateral	1.5
Bilateral	1.5
Historia familiar pre menopáusica y bilateral	5.4
Menor de 50 años	5 a 6
Mayor de 40 años	10.5
Antecedente personal de cáncer de mama	5.6
Antecedente personal de cáncer de ovario	1 a 2
Antecedente personal de cáncer de endometrio	1 a 2
Menarquía precoz	1.5
Menopausia tardía	1.5

Nuliparidad	1 a 2
Primer embarazo mayor de 26 años	3
Lactancia	0.5 a 1
Obesidad postmenopáusicas	2
Clase social alta	1 a 2
Alta ingesta de grasa	1.5
Tratamiento con estrógenos	1.5
Cáncer de mama contra lateral	3
Tamaño de las mamas	
Pequeñas	1
Medianas	1.1
Grandes	1.5
Quistes	1.6
Quistes más historia familiar	3.0
Hiperplasia sin atipia	1.6
Hiperplasia con atipia	1.8
Hiperplasia sin atipia	
Con historia familiar	2.1
Con calcificaciones	1.9
Hiperplasia con atipia	
Historia familiar	8.9
Calcificación	6.5
Nuliparidad	4.9
Primer embarazo mayor de 26 años	4.5

2.4. HISTORIA NATURAL DEL CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es una enfermedad sistémica y el poder conocer su biología, con un diagnóstico precoz, permite que los tratamientos sean menos agresivos y que se valore de forma adecuada el tratamiento sistémico.

Las mujeres entre los 50 a 55 años tienen un mayor riesgo y es usual que ellas

mismas descubran un nódulo, no doloroso, de consistencia firme, con márgenes no precisos y que en algunos casos retrae la piel o el pezón.

Seis meses después el nódulo duplica su tamaño y frecuentemente se encuentra adherido a la piel. Transcurrido un año se encuentra una adenopatía axilar, grande, dura y a veces dolorosa que dificulta el movimiento del brazo. El nódulo inicial ocasiona edema en la piel adyacente (piel de naranja) y se adhiere planos profundos de la pared torácica.

Pasados varios meses la mama se ulcera, se forman conglomerados ganglionares axilares y se puede encontrar evidencias de metástasis a distancia, como dolores óseos en columna vertebral y metástasis óseas, presencia de tos y disnea como manifestación de las metástasis pulmonares.

La paciente progresa en su cuadro a la anorexia, impregnación torácica para neoplásica, caquexia, pérdida de la actividad física, narcosis e infecciones, especialmente bronconeumonías, que con las metástasis pulmonares complican los cuadros infecciosos y a su vez llevan a la muerte.

Los recientes conocimientos sobre la biología tumoral y cinética celular permiten afirmar: El cáncer de mama no es una enfermedad localizada, es una enfermedad sistémica desde el inicio de la enfermedad.

Las vías de crecimiento del tumor comprenden:

1. Crecimiento intramamario: Asociado directamente con la angiogénesis, por lo que el tumor tiene la capacidad de duplicar su volumen en un periodo de 2 a 9 meses.

2. Extensión a tejidos vecinos: Se extiende inicialmente al tejido adiposo perimamario y por contigüidad a la piel y tejidos adyacentes. La aponeurosis del

pectoral mayor se infiltra directamente o partiendo de los vasos linfáticos. Se ha observado que el tejido muscular tiene cierta resistencia a la invasión tumoral.

3. Diseminación linfática: La mama posee una rica red de vasos linfáticos que se reúnen en el plexo retro areolar de Sharpey. Los cuadrantes externos drenan predominantemente hacia la vía axilar (corresponde el 75% del drenaje) y los cuadrantes internos hacia la mamaria interna (corresponde 0-20% del drenaje), mientras que el pezón y la areola pueden drenar a ambos.

3. a. Vía axilar

El drenaje linfático en esta vía se realiza escalonadamente (Niveles de Berg), por lo que el contenido axilar se ha dividido en tres niveles anatómicos, definidos por su relación con el músculo pectoral:

- **Nivel I:** Corresponde a la región de la axila baja, localizado entre el músculo dorsal ancho, el borde externo de la axila y el borde externo del pectoral mayor.
- **Nivel II:** Corresponde a la región de la axila media, localizado detrás o profundamente por debajo del músculo pectoral menor y los ganglios intrapectores de Rotter.
- **Nivel III:** Corresponde a la región del vértice de la axila, se localiza hacia dentro del borde interno del pectoral menor hasta el ligamento costo clavicular de Halsted. Hacia dentro de esta estructura la vena axilar entra al tórax, lo que clásicamente era conocido como ganglio centinela, a partir de esta área se origina la diseminación hematógena. (Este es un concepto que no se relaciona con el ganglio centinela actual.)

En ocasiones puede haber más de un ganglio centinela, la mayor parte de ellos localizados en el nivel I, un 20% pueden estar localizados en el nivel II (detrás del

pectoral menor), y en el nivel III puede ser un ganglio intramamario o el ganglio linfático de Rotter o localizarse en la cadena de la mamaria interna.

La linfadenectomía radical proporciona aproximadamente 20 ganglios linfáticos para el estudio anatomopatológico. La disección del nivel I proporciona en promedio 10 ganglios linfáticos y la disección de los niveles I y II una media de 11 a 17 ganglios linfáticos. Estudios han demostrado que los ganglios linfáticos del nivel I son positivos en el 96% de todas las pacientes. En teoría la información pronostica sería suficiente con la disección del nivel I. (62)

Rosen y col. encontraron metástasis en el nivel II en 7 de 1228 pacientes y de un 1% a 3% en el nivel III, siendo el ganglio centinela previamente negativo, denominando a esto metástasis salteadas (“skip” metástasis). (63)

El número mínimo de ganglios linfáticos que se deben resear para predecir la positividad se ha discutido, pero Mathiesen y col. demostraron que 10 son el número mínimo para estadificar la axila con precisión, lo cual lo han confirmado otros estudios publicados realizados por Krag y col. o Bland Ki y col. (64)(51)

Actualmente en tumores micro invasivos menores de 3 cm y en estados precoces se realiza la técnica del ganglio centinela, si esta es negativa para metástasis se obvia la linfadenectomía axilar y permite mejorar la estadificación, ya que enfocándose solo en un ganglio linfático las técnicas actuales aumentan la detección de micrometástasis y esto predice el resto de la axila entre un 94% a 98%.

3. b. Vía de la mamaria interna: En los estudios con designación al azar realizado por Urban JA y col. no demostró ventajas de supervivencia con la extirpación de los ganglios mamarios internos. (3)

4. Patogenia de las metástasis: El proceso de diseminación y metástasis es dinámico, si en ese proceso la célula tumoral no cumple los estadios necesarios

no se origina una metástasis detectable. El resultado final depende de las propiedades intrínsecas de las células tumorales y de la respuesta del huésped.
(64)

Cada uno de dichos pasos está sometido a múltiples influencias, y por ello en cualquiera de los puntos la célula tumoral puede morir. Estudios en ratones revelan que si bien diariamente se desprenden millones de células, solo algunas células tienen la capacidad de implantarse y desarrollarse hacia la metástasis. No todas las células que se encuentren en un momento dado circulando por el torrente sanguíneo o linfático tienen potencial metastásico y por ende relevancia clínica. El proceso es la propia heterogeneidad del tumor, solo unos pocos subclones de células poseen la capacidad adecuada para completar todos los pasos necesarios.

La secuencia puede dividirse en dos pasos: Invasión de la matriz extracelular y diseminación vascular y alojamiento de las células tumorales. Los tejidos normales están organizados en una serie de compartimientos separados entre sí por dos tipos de matriz extracelular: membranas basales y tejido conectivo intersticial. Aunque estén organizados de manera diferente, cada uno de los componentes de la matriz extracelular está compuesto por colágenos, glicoproteínas y proteoglicanos. Una célula maligna debe primero romper la membrana basal, atravesar el tejido conectivo intersticial, posteriormente romper la membrana basal vascular y pasar a la circulación; dicho ciclo ha de repetirse cuando el émbolo de células tumorales se extravasa en un lugar distante.

La invasión de la matriz extracelular requiere que las células se desprendan entre sí; seguidamente han de unirse a los componentes de la matriz y degradarlos, y finalmente es necesario un proceso de migración. Las células normales están adheridas entre sí y a sus alrededores mediante diversas moléculas de adhesión; de especial importancia son las cadherinas, una familia de glicoproteínas transmembrana. Las cadherinas epiteliales median la adherencia homotípica en un tejido epitelial, motivando así la constitución homogénea de un tejido; sin

embargo, se sabe que en diversos tumores epiteliales como los adenocarcinomas de colon o mama, existe una regulación a la baja de la expresión de dichas cadherinas. Esto facilita el desprendimiento de las células. Posteriormente las células tumorales han de adherirse a los componentes de la matriz. Existen estudios que corroboran que la fijación de las células tumorales a la laminina y fibronectina de la matriz es importante para la invasión y metástasis, como los realizados por Ponce ML y Col. y Filera IJ y col. (7)

Las células epiteliales normales expresan receptores de alta afinidad para la laminina de la membrana basal, polarizados en una sola superficie celular. Sin embargo las células tumorales tienen dichos receptores distribuidos por todo el perímetro de la célula.

Además parece existir una correlación positiva entre la capacidad de invasión y la densidad de dichos receptores en los cánceres de mama. Asimismo las células malignas expresan otro tipo de receptores, las integrinas con capacidad para unirse a otras moléculas de la matriz, como la fibronectina, el colágeno o la vitronectina. Las células tumorales generan proteasas que degradan activamente los componentes de la matriz, practicando de esa manera los “canales” necesarios para la migración.

Existen tres tipos fundamentales de proteasas: serin-proteasas, cisteín-proteasas y metalo-proteinasas. Diversos trabajos apoyan el papel de la colagenasa IV (metaloproteínasa) en la invasión y metástasis, basado en la observación de que muchos carcinomas poseen altas concentraciones de colagenasa IV, en cuantías mucho más altas que las lesiones adyacentes no invasoras, y que la inhibición de dicha colagenasa en animales de experimentación conducía a una menor tasa de metastatización.

El movimiento a través de las zonas degradadas parece que tiene lugar por la secreción de citosinas por parte de la propia célula tumoral. Se ha caracterizado una proteína de 55 KD que al unirse a receptores específicos de la célula tumoral

induce la motilidad. Asimismo los productos generados por la degradación de la matriz tienen actividad quimiotáctica sobre la célula tumoral.

Una vez en la circulación, las células tumorales son especialmente vulnerables a los mecanismos de defensa del huésped (en general son lisadas por los Linfocitos T NK). Dentro de la circulación las células tienden a agregarse en cúmulos, formados por células tumorales y elementos formes de la sangre (la adherencia a plaquetas parece aumentar la probabilidad de supervivencia de los émbolos y la adhesividad a tejidos distantes).

La detención y extravasación de émbolos tumorales en lugares distantes implica la adherencia al endotelio, seguida de la salida a través de la membrana basal. En este proceso están implicadas moléculas de adhesión y enzimas proteolíticas. Es de especial interés la molécula CD44, que media la migración de linfocitos T. Estudios revelan que los tumores expresan variantes de dicha molécula con capacidad para adherirse al endotelio y que dicha expresión capacita a las células tumorales para la diseminación extravascular.

El patrón de metástasis del cáncer de mama está siendo estudiado desde 1889, cuando Paget sugirió que este no era un proceso al azar, si no que se debía a una afinidad específica de las células tumorales por algunos órganos. Esta hipótesis está avalada con estudios experimentales en ratones. Con el advenimiento de los shunts arteriovenosos para paliar la ascitis maligna se permitió estudiar algunos factores que afectan la diseminación metastásica en humanos. Por ejemplo Tarin y col. demostraron que aunque el shunt funcionara varios meses, en la mitad de los pacientes no se formaron otros lugares de metástasis extra abdominales.(64)

2.4.1 Micrometástasis y técnicas utilizadas para su determinación

El concepto de la micrometástasis en el cáncer de mama fue introducido por Huvos y col. en el año 1971, estudiaron 208 casos donde observaron que las pacientes con tumores menores de 2 mm en los ganglios linfáticos, tenían un

porcentaje de supervivencia mayor que las pacientes que tenían el ganglio linfático afectado con tumores mayores de 2 mm. Posterior a esto en el año 1997 Attiegh y col. publicaron un estudio con 14 años de seguimiento, el que confirma estas observaciones. (17)

Se ha definido micrometástasis como: "Focos de células tumorales menores de 1-2 mm en una zona ganglionar" y así está incluida en la clasificación TNM. Para poder detectar una micrometástasis se requieren métodos específicos, como cortes histológicos seriados, inmunohistoquímica (IHQ) y biología molecular. Pero para aplicar estas técnicas es imprescindible seleccionar adecuadamente el ganglio centinela.

Las primeras metástasis en el cáncer de mama son linfáticas, los mecanismos que regulan las metástasis en los ganglios linfáticos son inciertos. De hecho la relación funcional entre los ganglios linfáticos y las metástasis son motivo de debate. Algunos señalan que son barreras mecánicas y otros que son inmunológicas. Lo que sí está demostrado es que las metástasis de los ganglios linfáticos pueden dar lugar a una nueva diseminación (hematógenas o linfáticas) de las células tumorales.

Ya que la afectación de los ganglios linfáticos sigue siendo el factor pronóstico más importante en el cáncer de mama, es interesante y relevante poder utilizar técnicas moleculares en su detección.

El ganglio linfático es una estructura tridimensional, el corte histológico corresponde solo a un plano de este y es posible que en este plano estudiado no se observen las células tumorales. Esto se soluciona al realizar cortes seriados y así se aumenta la posibilidad de encontrar metástasis.

Guenther y col. estudiaron 145 pacientes para la detección del ganglio centinela utilizando colorantes vitales. Estos ganglios linfáticos identificados como centinelas se estudiaron por medio de cortes seriados y con la coloración de H&E. Se identificaron ganglios centinelas en 103 pacientes (71%) hubo concordancia entre

el estatus de la axila y del ganglio centinela en 100 de los 103 casos (97.1%), mientras que en 3 pacientes (9.7%) se obtuvieron falsos negativos. (Esto se relacionó con una curva de aprendizaje, puesto que en los últimos 80 ganglios no había ni un solo falso negativo). Harveit desde 1984 recomienda que los cortes del ganglio centinela se orienten hacia la zona del vaso linfático aferente, ya que esta región es donde resulta más probable encontrar las metástasis. (65,66)

En los casos en que la afectación del ganglio linfático es tan pequeña como las micrometástasis, cabe la posibilidad de confundir a los macrófagos propios del ganglio con células epiteliales o viceversa.

Dado que las células epiteliales normales y las células tumorales contienen en su citoplasma moléculas propias del tejido epitelial, como son las citoqueratinas (CK) o el antígeno epitelial de membrana (EMA), la realización de la IHQ con anticuerpos para detectar estas moléculas permite su identificación específica.

En un estudio de 296 pacientes donde se realizó la técnica para detección del ganglio centinela, se realizaron cortes seriados con H&E e IHQ para la detección de CK. En este estudio se vio que la proporción de falsos negativos disminuyó considerablemente, pero no llegó a cero. (66)

2.5. GANGLIO CENTINELA

El ganglio centinela está definido como el ganglio linfático que recibe de forma directa y en primer lugar el drenaje linfático de la lesión tumoral. Existen técnicas morfológicas y no morfológicas para su estudio.

Se trata del primer ganglio de drenaje del tumor mamario tanto hacia la axila como a la cadena mamaria interna o a otra zona extra-axilar. Esta técnica posibilita la detección y el estudio exhaustivo de este primer ganglio y evita la realización de la linfadenectomía innecesaria.

El principio es básicamente el seguimiento de una forma ordenada de la

diseminación metastásica mediante un trazador (colorante, isótopo radioactivo o la combinación de ambos), se utiliza el patrón de drenaje tumoral y se determina la localización del ganglio centinela en la región linfática donde ha drenado dicho trazador.

La técnica de la biopsia del ganglio centinela es en la actualidad la más adecuada para la estadificación regional del cáncer de mama. Basado en los estudios de Halsted, el cual refería una diseminación secuencial de las células tumorales a través de los vasos linfáticos y demostró que la neoplasia maligna drena inicialmente de forma ordenada y predecible hacia un ganglio linfático determinado, denominado ganglio centinela, localizado en un conjunto ganglionar y de una región concreta, la diseminación metastásica de las células tumorales alcanzan este primer ganglio y en un estadio posterior toda la cadena ganglionar. En este concepto se fundamenta la técnica del ganglio centinela. (9)

Diversos estudios han demostrado que cuando las células del carcinoma invasor inician su proceso metastásico hacia los ganglios linfáticos regionales, lo hacen primeramente hacia el ganglio linfático más cercano, siguiendo las condiciones hemodinámicas propias del flujo normal de la linfa. Una vez estudiada histológicamente esta primera estación de drenaje ganglionar, tiene carácter pronóstico, si es negativo se espera que el resto de la cadena ganglionar también esté libre de metástasis tumorales.

En 1960 Gould y col. definieron por primera vez el ganglio centinela, en tumores de parótida como un ganglio linfático anatómicamente constante, situado en la unión de la vena facial anterior y posterior. El análisis de este ganglio linfático durante la cirugía del cáncer de parótida determinaba si el paciente era o no sometido a disección linfática radical en el cuello. (19)

En 1963 Oliver Cope, mencionaba al "Delphian node" refiriéndose al ganglio linfático que pronosticaría el proceso natural de la enfermedad, en cuanto a la afectación de un órgano próximo a la lesión tumoral maligna. (19)

En 1977 Ramón Cabañas propago el concepto del ganglio centinela mediante sus estudios del drenaje linfático del cáncer de pene. Al igual que Gould afirmaba que el ganglio centinela presentaba un lugar fijo anatómicamente en el cáncer de pene. Este lo definió como el primer ganglio linfático de un territorio o lecho linfático que recibe las células cancerosas procedentes de un tumor primario a través de los canales linfáticos aferentes. Posteriormente Cabañas, Morton y col. aplicaron este principio al manejo del melanoma maligno, especialmente en los localizados en el tronco, cuyo drenaje linfático puede ser variable. Utilizaron azul de isosulfan inyectado alrededor del melanoma o de la cicatriz de extirpación de la lesión, buscando luego un ganglio linfático teñido que llevara el azul de isosulfan. La publicación de Morton fue así mismo importante ya que fue el primero en mencionar la importancia de la curva de aprendizaje en esta técnica quirúrgica.(67,68)

A principios de los 90 la biopsia del ganglio centinela empezó a aplicarse en el cáncer de mama, primero utilizando colorantes y posterior trazadores isotópicos coloidales. (69,70)

En el estudio de Cserni y col. Además de la IHQ para CK, incluyeron el antígeno epitelial de membrana (EMA) en 148 pacientes, con lo que demostraron un incremento significativo estadísticamente en la detección de la patología, usando los dos marcadores. (18)

También en estudios retrospectivos ha quedado de manifiesto la importancia de la IHQ, como el estudio de Waver y col. en el analizaron mediante IHQ los cortes obtenidos de ganglios centinelas y no centinelas. Encontraron un rango global de conversión de negativos por H&E, a positivos de un 10.3%, donde la identificación de las micrometástasis aumento de forma significativa. (28)

En el grupo de Motomura y col. se ha probado con éxito la realización del rastreo y estudio inmunohistoquímico transoperatorio del ganglio centinela. Aunque fue

evidente la dificultad para obtener el diagnóstico de micrometástasis en las improntas citológicas transoperatorias, ya que pueden ser la principal causa de falsos negativos. (71)

En el estudio de Kataoka y col. presentaron excelentes resultados de identificación de metástasis en ganglios centinelas, utilizando la reacción en cadena de polimerasa con transcriptasa reversa en tiempo real (RT-PCR). Schoenfeld y col. demostraron que 40 ciclos de RT-PCR puede ser el método óptimo para detectar micrometástasis, aunque sería necesario validar la técnica. Pero aun toca esperar otros estudios que evalúen la facilidad del procedimiento en grandes poblaciones y una comparación detallada con los resultados de IHQ. (28)

El tamizaje actual con mamografías ha conseguido que se detecten cada vez más carcinomas de mama pequeños y con ganglios linfáticos negativos en el estudio histológico de rutina. Los nuevos métodos de detección de micrometástasis permiten identificar en un 33% de los casos las metástasis ocultas, esto cambia el estadio del tumor y explica el porqué pacientes en un principio en el mismo estadio podían tener diferencias en el pronóstico, en la supervivencia libre de la enfermedad y supervivencia global. El primer estudio prospectivo fue realizado por el Internacional Breast Cancer Study Group, donde estudiaron secciones seriadas en 921 casos de cáncer de mama en estadio I, encontrando metástasis en el 9%. A los 5 años la supervivencia libre de enfermedad para pacientes con metástasis era del 58%, comparadas con las pacientes con ganglios linfáticos no afectados que era del 74% ($p=0.003$) y la supervivencia global era del 79% y 89% respectivamente ($p=0.002$). Otros estudios encontraron resultados parecidos como el de Neville y col en 1991. Las diferencias de los resultados actuales con los primeros estudios de micrometástasis, en los que las micrometástasis no se consideraban relevantes para el pronóstico, tienen que ver con las diferencias en el tamaño de la población, el tiempo de seguimiento, el uso de la IHQ y la combinación de ellos. En el cáncer de mama el objetivo fundamental de la realización de la técnica del ganglio centinela, ha sido reducir la morbilidad asociada a la práctica habitual de la linfadenectomía axilar. Como ya se sabe, el

estado anatomopatológico de los ganglios axilares son el factor pronóstico más importante, la afectación de estos disminuye hasta en un 40% la supervivencia a los 5 años de estas pacientes.(72,73)

El diagnóstico cada vez más precoz del cáncer de mama gracias a las campañas de cribaje, condiciona una menor afectación de los ganglios axilares. A esto se le une la tendencia actual de tratamientos conservadores y plantea la necesidad de técnicas diagnósticas alternativas. El ganglio centinela pasa a ser el mejor tejido de referencia para tomar una biopsia de forma selectiva y analizarlo histológicamente mediante las técnicas apropiadas. Se han realizado estudios referente a la técnica para la localización del ganglio centinela en el carcinoma de mama y el uso de los marcadores, algunos utilizan solo colorante azul de isosulfan, otros solo radioisótopos y otros combinan ambos marcadores. Algunos autores apoyan el hecho de que el colorante azul de isosulfan mezclado con el radioisótopo, localizan en un 98% el ganglio centinela.(74–77)

En 1993 se aportaron resultados de una serie de 22 pacientes con cáncer de mama. A estas pacientes 2 o 3 horas antes de la cirugía, se les inyectó una solución coloidal de ^{99m}Tc en el perímetro del tumor, el radiofármaco alcanzó los vasos linfáticos fluyendo hacia los ganglios linfáticos más próximos, donde las partículas finalmente son capturadas por los macrófagos locales. Durante la cirugía con una sonda gamma se localizaban los ganglios linfáticos "calientes" que era considerado el ganglio centinela. A todas las pacientes se les realizó linfadenectomía axilar completa y todos los ganglios se estudiaron histológicamente. Se identificó el ganglio centinela en 18 casos (81.81%), de estos 7 se encontraron metástasis ganglionares con ganglio centinela positivo y en los otros 11 casos el ganglio centinela era negativo, al igual que el resto de la linfadenectomía axilar. En ninguno de los 4 casos que no se encontró el ganglio centinela se encontró afectación ganglionar metastásica y no se encontraron falsos negativos. En 3 de los 7 casos con ganglio centinela positivo (42.85%) solo este era el afectado. Estos resultados mostraron que de las 22 pacientes, 15 de ellas (68.18%) podían haber sobrevivido sin necesidad de la disección radical de

la axila y de estas 11 casos (73.33%) tenían la indicación de un ganglio centinela negativo. Estos resultados despertaron el interés de la comunidad científica y a partir de ese momento se iniciaron estudios en poblaciones más amplias, modificando la técnica original, con la asociación de colorante y el isótopo de ^{99m}Tc , cambiando los lugares de punción y estudiando el flujo linfático. Este estudio fue básico para modificar la indicación de la linfadenectomía axilar completa y su morbilidad posterior como dolor, parestesias, linfedema, seromas, infección y limitación de la movilidad de la extremidad.(70)

El anatomopatólogo se ve enfrentado a estudiar las metástasis en el ganglio centinela durante la cirugía y esto define si se realiza o no la disección axilar completa. Contamos con varios métodos para estudiar el ganglio centinela que conllevan o no la morfología.

1. Morfológicos:

- Citología con improntas, utilizando la coloración de hematoxilina y eosina (H&E). Se realiza el estudio en el acto quirúrgico.
- Análisis de secciones seriadas múltiples congeladas. Se realiza el estudio durante el acto quirúrgico.
- Histología clásica con la coloración de hematoxilina y eosina (H&E). Se realiza estudio postquirúrgico.
- Inmunohistoquímica. Se realiza estudio postquirúrgico.

2. No morfológicos:

- Análisis molecular. Durante o después del acto quirúrgico.
- Citometría de flujo. Posterior al acto quirúrgico.

2.5.1. Indicaciones de la técnica del ganglio centinela

La localización del ganglio centinela en el cáncer de mama debe considerarse en pacientes con biopsia concluyente para carcinoma de mama o en su defecto punción con aguja compatible, a las que se les ha planeado cirugía y linfadenectomía axilar, y que no presentan ganglios linfáticos clínica o ecográficamente sospechosos de infiltración metastásica.

En la actualidad las indicaciones aceptadas por el Consenso realizado por la Sociedad Española de Senología y Patología mamaria (Noviembre del 2013) son las siguientes para la biopsia selectiva del ganglio centinela (BSGC):

A. Criterios de indicación:

1. Carcinomas infiltrantes T1, T2 y T3, siempre que la axila sea clínica, ecográfica y patológicamente (si procede, ya sea citológica o histológicamente) negativa.

2. En los casos de carcinoma intraductal con:

a. Indicación de mastectomía.

b. Alto riesgo para microinfiltración o infiltración en base a alguno de los siguientes criterios (evidencia 2++):

Diámetro ≥ 3 cm

Palpable

Alto grado histológico

Comedonecrosis

3. En el carcinoma de mama en el varón se siguen las mismas indicaciones que en la mujer.

B. Criterios de exclusión o contraindicación:

1. La verificación preoperatoria de afectación ganglionar mediante pruebas de imagen (ecografía) y al menos, citología de las adenopatías sospechosas con diagnóstico compatible con metástasis de carcinoma.
2. Carcinoma inflamatorio.
3. Radioterapia axilar previa a dosis de 50 Gy.
4. Carcinoma localmente avanzado con afectación ganglionar, en ausencia de tratamiento sistémico primario.

C. No constituyen criterios de contraindicación:

1. Biopsia escisional previa, siempre que no aparezcan criterios de exclusión.
2. Cirugía mamaria plástica de aumento o reducción previa.
3. Tumores multifocales y multicéntricos (evidencia 1).
4. Cirugía conservadora con BSGC previa por carcinoma: no hay evidencia para contraindicar una nueva BSGC, aunque es necesaria la valoración individual de cada caso en función de la dosis de irradiación recibida en la axila (evidencia 1+).
5. Mujeres gestantes o puérperas lactantes, previa retirada de la lactancia 24 h. Se recomienda utilizar la mínima dosis posible de trazador y el mismo día de la cirugía. En estos casos, está contraindicado el uso de cualquier colorante vital.

D. Consideraciones especiales:

1. En pacientes con axila clínica/ecográficamente negativa de inicio (cN0), puede realizarse la BSGC tanto previa al tratamiento sistémico primario como posterior al mismo (evidencia 1+).
2. En pacientes cN1/N2 de inicio con negativización clínica y ecográfica de la axila tras la neoadyuvancia (cyN0), puede realizarse la BSGC después del tratamiento sistémico primario y evitar la linfadenectomía axilar cuando el GC sea negativo (evidencia 1-). No obstante, series recientes aportan resultados controvertidos al

respecto por la alta tasa de falsos negativos secundarios a la terapia sistémica primaria.

2.5.3. Controversias en la utilización de la técnica del ganglio centinela

A pesar de que la capacidad de la técnica del ganglio centinela para predecir metástasis en los ganglios axilares, hay controversias sobre la técnica por el hallazgo de falsos negativos. En el Hospital Clínico San Carlos de Madrid, se ha comprobado que si el ganglio centinela es negativo, el resto de la cadena ganglionar también lo será, existiendo solo un 0.18% de falsos negativos. (78,79)(65-66)

Edad: Las pacientes con edad avanzada presentan alteraciones de la circulación linfática, que puede provocar un defecto en la migración del marcador. Sin embargo esto no afecta la fiabilidad de la técnica, por lo que si la migración del marcador es adecuada, no hay contraindicación.

Obesidad: Se ha observado que en las pacientes obesas se puede dificultar la migración del marcador. (80)

Multicentricidad: Existe evidencia limitada en la técnica. En la actualidad se realiza la biopsia mediante punción peri areolar del radio trazador.

Embarazo: En la gestación el colorante vital está contraindicado y el radioisótopo (Tc99m) no se contraindica. Aun no existe evidencia clara para recomendarla en mujeres gestantes, pero se han comunicado varios casos en la literatura. (81)(68)

Pacientes sanas con mutación del gen BRCA: Dado que existe un porcentaje de pacientes con carcinoma oculto de la mama en las que puede existir afectación axilar, la técnica del ganglio centinela no añadiría morbilidad en caso de ser candidata a una mastectomía profiláctica.

Portadoras de prótesis mamaria: Se ha supuesto que conllevaría a una menor migración del radio trazador, pero la mayor parte de los grupos no la contraindican.

Cirugía previa en la glándula mamaria: La cirugía previa se ha considerado clásicamente una contraindicación por posibles alteraciones en la circulación linfática. Para que el mapa linfático se altere tienen que ser cirugías extensas como masto plastias de reducción, con alteración de la arquitectura mamaria, aunque actualmente no es una contraindicación formal.

Pacientes con cirugía previa y con técnica del ganglio centinela realizada: No existe evidencia para recomendar un nuevo procedimiento una vez existe la recidiva tumoral.

2.5.4. Factores pronóstico del ganglio centinela

Debemos tener en cuenta que el concepto de factores pronósticos y predictivos son diferentes. Los factores pronósticos indican asociación con un periodo libre de enfermedad, mientras que los factores predictivos se refieren a la respuesta al tratamiento.

Según el colegio Americano de Patólogos (CAP) están categorizados en tres grupos o niveles:

- Categoría I: Son factores bien respaldados en la literatura científica, por ejemplo el tamaño tumoral, el estado ganglionar, el tipo histológico, el recuento de mitosis, receptores hormonales y oncogén HER2.
- Categoría II: Son factores que se han estudiado pero que requieren una validación estadística más rigurosa como son p53 o la invasión vascular en el tumor.

- Categoría III: Son factores que no han sido estudiados del todo o que no han demostrado un valor pronóstico-predictivo, como son la ploidía celular, la catepsina D o la angiogénesis entre otros.

El sistema de estadiaje del cáncer de mama se basa en evaluar meticulosamente el tumor primario (T), los ganglios linfáticos regionales (N) y las metástasis a distancia (M), fue propuesto por primera vez en 1954 por la UICC y ha sido revisado varias veces hasta su publicación por el AJCC e implementado a nivel mundial.

2.5.5 Factores pronóstico clásicos

Afectación ganglionar (N): El número de ganglios linfáticos axilares positivos es muy importante en el cáncer de mama infiltrante que ha sido tratado con mastectomía. La supervivencia, la recidiva, la velocidad en aparecer la recidiva y el fracaso en el tratamiento están relacionados directamente con el número de ganglios linfáticos axilares positivos. Sin evidencia de metástasis ganglionar la sobrevida a los 5 años es del 87%, mientras que la presencia de algún ganglio positivo la disminuye a un 75%, al tener de 1 a 3 ganglios linfáticos comprometidos la sobrevida es del 64.5% y con 4 o más ganglios linfáticos positivos la sobrevida decae a un 34.5%. Obviamente si los ganglios linfáticos axilares macroscópicamente se observan comprometidos el pronóstico es desfavorable. Se ha publicado que las pacientes con micrometástasis estudiadas en secciones microscópicas seriadas y que son menores de 2 mm, tienen una sobrevida comparable con las pacientes sin metástasis ganglionares.

Una investigación prospectiva del grupo de estudio internacional del cáncer de mama, estudiaron los ganglios axilares homolaterales considerados negativos, se realizaron cortes seriados y luego del estudio histológico sistemático, se encontraron micrometástasis en un rango del 9 y 20%, estas pacientes con micrometástasis tuvieron menos tiempo de sobrevida libre de enfermedad y

sobrevida global de la enfermedad después de 5 años, que aquellas cuyos ganglios se mantuvieron negativos después de estudiarlos con cortes seriados.

Las micrometástasis también se correlacionan con la invasión vascular peritumoral y con el tamaño del tumor. Si existe invasión vascular y el tamaño del tumor es mayor de 2 cm, es probable que existan micrometástasis. Los métodos inmunohistoquímicos y moleculares para el diagnóstico de las metástasis ocultas en los ganglios linfáticos axilares, han permitido mostrar que estas pacientes tienen mayor índice de recurrencia y una peor supervivencia especialmente el carcinoma ductal infiltrante.(82,83)

Las pacientes con metástasis de los ganglios linfáticos supraclaviculares y de la cadena mamaria interna tienen una sobrevida a los 5 años del 56% y 52% respectivamente y en caso de ser las dos regiones afectadas la sobrevida es del 24%. Las metástasis en los ganglios supraclaviculares son de pronóstico ominoso, ya que por lo general son alcanzados después de comprometer los ganglios axilares y de la mamaria interna.

Tamaño tumoral (T): El tamaño macroscópico de las neoplasias malignas primarias infiltrante también es un factor pronóstico importante. Existe relación directa entre el tamaño del tumor y las metástasis ganglionares axilares. En tumores menores de 1 cm existen metástasis en un 26%, si el tumor es mayor de 10 cm existen metástasis en un 78%. Un tumor de 2 cm de diámetro máximo, tiene un pronóstico y supervivencia mejor siempre que se compare con tumores más grandes.

Grado tumoral: Bloom en 1950 propuso un método que valoraba tres factores:

- El grado de formación de túbulos.
- La regularidad en el tamaño, la forma y las características de tinción nuclear.
- La hipercromasia nuclear y la actividad mitótica.

Así fue como los tumores se clasificaron en bajo, moderado y alto grado de malignidad. Más tarde Bloom y Richardson modificaron el sistema de graduación añadiendo a cada uno de los tres factores un valor de I a III, que corresponde a leve, moderado o marcado. (**Tabla 8**)

Actualmente basándose en parámetros que corresponden al tamaño del tumor, el grado histológico y el estado de los ganglios se calcula el índice pronóstico de Nottingham (NPI), siendo mejor el pronóstico en cuanto menor es el valor del NPI.

Tabla 8. Grados histológicos de Bloom y Richardson modificados.

Grados histológicos de Bloom y Richardson modificado.
1. Formación del túbulo
Puntaje 1: Mayor del 75% del tumor tiene túbulo
Puntaje 2: 10% a 75% de tumores tiene túbulo
Puntaje 3: Menor del 10% de formación de túbulo
2. Tamaño nuclear
Puntaje 1: Núcleos del tumor similar a los núcleos de las células ductales normales (2-3xGR)
Puntaje 2: Núcleos de tamaño intermedio
Puntaje 3: Núcleos muy grandes, usualmente vesiculares con nucléolos prominentes
3. Conteo de mitosis
Por 10 HPF con objetivo de 40x y área de campo de 0.196 mm ²
Puntaje 1: 0-7 mitosis
Puntaje 2: 8-14
Puntaje 3: Mayor o igual a 15

Tipo tumoral: Los carcinomas de mama tubular, mucinoso y adenoide quístico son de bajo grado, en estos es muy poco frecuente encontrar metástasis axilares y tienen un relativo buen pronóstico.

Los carcinomas poco diferenciados como son los carcinomas inflamatorios, carcinomas con células en anillo de sello y los carcinosarcomas son considerados muy agresivos y de mal pronóstico. Por ejemplo el carcinoma inflamatorio tiene una supervivencia a 5 años de un 11%.

Invasión del estroma: Es un factor de crucial importancia en el pronóstico de las pacientes, puesto que el carcinoma *in-situ* o no invasivo es casi siempre curado con la mastectomía. La identificación de la invasión cuando se intenta conservar la mama es de altísima importancia, tanto como la determinación de la enfermedad *in situ*, dentro y fuera del componente invasivo.

Invasión vascular: La invasión linfática y peri tumoral tiene un valor predictivo sobre la recurrencia local precoz y las metástasis a distancia, e indican una mayor probabilidad de fracaso terapéutico. Se utilizan técnicas de inmunohistoquímica para determinar antígenos de las paredes vasculares, como son el factor VIII, CD31 o CD34 y así no tener duda de si se trata de una invasión vascular.

2.5.6 Factores pronóstico biológicos

Cinética celular: Este factor pronóstico tiene la ventaja de que es cuantificable, objetivo, independiente del estado de los ganglios axilares y aplicables a las pacientes con ganglio centinela negativo. La desventaja es que parece tener un dudoso significado clínico en las mujeres con ganglios linfáticos positivos para metástasis. Se utiliza el índice de marcaje con timidina (IMT) o el análisis del DNA por Citometría de flujo.

- El IMT indica la proporción de células que están en fase S dentro del tumor. Por lo general los tumores de bajo grado tienen un IMT bajo y los que tienen un IMT alto tienen un elevado potencial de proliferación y de recidiva de una forma precoz. Este índice se relaciona de manera inversa con el contenido de receptores de estrógeno (RE).

- La Citometría de flujo proporciona un análisis rápido, automatizado y determina la ploidía del tumor. Se realiza la determinación de la fracción de células en fase S (FSS), que equivale al IMT, además estudia el índice de DNA que consiste en comparar el contenido del DNA de las células tumorales con el de las células benignas.

Receptores hormonales: Los estrógenos y progestágenos son hormonas asteroideas implicadas en la fisiopatología de múltiples aspectos de la patología de la glándula mamaria. Ambos tipos de hormonas intervienen conjuntamente en el crecimiento, diferenciación y supervivencia del epitelio mamario. Son de crucial importancia en el desarrollo de las neoplasias mamarias durante los años reproductivos (desde la menarquía a la menopausia); tras la menopausia, la actividad de las aromatasas periféricas transforma los andrógenos suprarrenales en estrógenos, suministrando estímulo hormonal tejido mamario.

Se observa en tejido maligno no invasivo, una concentración de receptores esteroideos unas 15 veces mayor a la del tejido normal. Su activación se ha relacionado fundamentalmente con un aumento de la replicación celular (no así en potencial metastático), y se cree que el aumento de la expresión de receptores esteroideos es un evento clave e inicial en la tumorigénesis mamaria.

El tejido mamario que sobre expresa el receptor de estrógenos muestra una tasa de malignización 6,5 veces mayor que el tejido con una expresión normal. Desde el trabajo de Barbará Mason y col. en 1983 en el que se determinó la expresión de PgR y ER de todos los cánceres de mama incidentes entre 1976 y 1980 de la ciudad de Auckland (1.136 casos) se acepta la importancia clínica de la positividad de la expresión de ER y PgR. En este estudio se constató que cuando ambos receptores eran positivos, existía una supervivencia significativamente mayor que cuando eran negativos; dicho efecto se probaba en ausencia de los tratamientos hormonales existentes hoy en día para bloquear la actividad replicativa inducida por esteroides femeninos. Hoy por hoy se acepta como factor pronóstico molecular

de importancia en enfermedad localizada; en enfermedad avanzada los datos son más controvertidos; si bien la actividad de estos receptores se ha relacionado con actividad replicativa, no está tan claro que posean actividad facilitadora de producción de metástasis.

Así, según Hilsenbeck y col. y Costa y col. a los 5 años tras el diagnóstico del cáncer de mama la importancia pronóstica derivada de la expresión de ER y PgR se pierde (en parte porque la replicación tiende a volverse hormono independiente con el avance de la enfermedad). Sin embargo, Chang y col. Publicaron un análisis retrospectivo con 346 pacientes en el que estudiaron la influencia de ciertos datos clinicopatológicos del tumor primario en el desarrollo de la enfermedad una vez que se desarrollan las metástasis; curiosamente encontraron asociación positiva entre la expresión del PgR (y no del ER) en el tumor primario con una evolución más benigna en la enfermedad metastásica.

Lo que está muy claro hoy en día es el beneficio que se obtiene en todas aquellas pacientes con receptores positivos merced al bloqueo hormonal con los diferentes agentes disponibles. El meta-análisis decisivo fue el publicado en 1998 por el *Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group*, en el que se analizan 36.689 pacientes incluídas en 55 ensayos clínicos. En estos ensayos se aleatorizaba el uso de Tamoxifeno adyuvante (durante diferentes períodos de tiempo según el estudio; desde 1 año hasta 5 años) frente a la ausencia de Tamoxifeno, en mujeres con cáncer de mama localizado con o sin ganglios positivos. Se encontró un beneficio global consistente determinado por una reducción de la *Odds Ratio* (OR) de recaída del 40% y una reducción de la OR de muerte por cáncer de mama del 23%.

Oncogén HER2: Existen diversos mecanismos moleculares a nivel celular, que pueden funcionar como oncogénicos. Diversos oncogenes codifican para receptores mutados de factores de crecimiento, con actividad tirosín-quinasa cuya activación por ligandos (conocidos para unos receptores y desconocidos para

otros) desencadena la activación de las vías de señalización celular que llevan a la proliferación descontrolada. La mutación más común es la delección del dominio extracelular; en otras ocasiones se observan mutaciones puntuales que confieren la propiedad de estar activados de modo constitutivo. Con menos frecuencia se deleciona el extremo carboxiterminal de dichos receptores y así se elimina una secuencia reguladora negativa de la actividad del receptor.

Sin embargo para el oncogén de más relevancia identificado en el cáncer de mama en los últimos años, el mecanismo por el que tiene lugar la oncogénesis es por un aumento de la expresión del receptor no mutado; el subsiguiente incremento de la actividad tirosín-quinasa induce transformación celular. Hablamos del oncogén HER2 (también denominado erbB-2 o neu) es un gen localizado en el cromosoma 17q12; se trata de una proteína de membrana que corresponde al receptor tipo 2 (de 4 descritos hasta la actualidad) del factor de crecimiento epidérmico. La amplificación del gen del HER2 se encuentra de un 25 a 30 % de los cánceres de mama humanos y se correlaciona con más incidencia de metástasis en los ganglios regionales, grado histológico más agresivo y presencia de estadios más avanzados al diagnóstico. Se relaciona con resistencia a diversos agentes quimioterápicos y hormonales.

Los análisis multivariantes apoyan que su expresión ejerce una influencia (negativa) independiente del resto de los factores pronósticos en la supervivencia en pacientes con ganglios positivos respecto a la no expresión. El gen HER2 humano codifica una proteína de 1255 aminoácidos perteneciente a la familia de los receptores tirosín-quinasa (RTK). El producto del HER2 es un miembro del subgrupo de los receptores del factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal Growth Factor Receptor*-EGFR) dentro de la superfamilia RTK, que incluye tanto al EGFR (codificado por el erbB-1), como a las proteínas codificadas por los genes erbB-2, erbB-3 y erbB-4. Los cuatro genes codifican una proteína con actividad tirosín-kinasa con dominios de membrana sencillos y dos dominios celulares ricos en cisteínas. Los cuatro receptores se coexpresan en diferentes combinaciones y

se pueden encontrar en una gran variedad de tejidos, excepto el tejido hematopoyético.

Mientras que HER2 se expresa a concentraciones bajas en diversas células normales, en varios cánceres se sobre expresa. En general este hecho está causado por amplificación genética o un incremento del número de genes *erbB-2* en el núcleo. Esta sobreexpresión desempeña un papel en la progresión del tumor, produciendo títulos elevados de crecimiento celular y transformación oncogénica. A nivel práctico, la significación del HER2 en el cáncer de mama es múltiple: el cáncer de mama evoluciona desde la lesión pre maligna no invasiva (Carcinoma *in-situ*) hasta el carcinoma metastásico, pasando por los estadios localizados. Es posible encontrar la sobreexpresión del HER2 en todos los estadios del cáncer de mama, pero no se ha encontrado en lesiones benignas de la mama; esto sugiere que el gen no se amplifica antes de un verdadero estado maligno. La sobreexpresión se mantiene en lesiones metastásicas, sugiriendo una función continuada del HER2. Hay un trabajo con gran implicación clínica en este aspecto, de Niehans y col. en él analizaron en autopsia con inmunohistoquímica la expresión de esta oncoproteína; el trabajo está realizado con 30 pacientes. De ellos, 18 sobre expresaban el HER2 en las metástasis, 15 (80%) de los cuales lo sobre expresaban en todas y todos los pacientes con sobreexpresión en tumor primario, mostraban sobreexpresión en las metástasis.

De hecho, algún trabajo sugiere que la prevalencia de sobreexpresión del HER2 en lesiones metastásicas a distancia es mucho mayor del 30% presente en las lesiones localizadas en la mama, sugiriendo una selección positiva de las clonas celulares que sobre expresan este factor (por ejemplo, el trabajo de Braun y col. encuentra en médula ósea una prevalencia del 60% de sobreexpresión del HER2 en las micrometástasis del cáncer de mama en médula ósea).

Esto abrió la posibilidad al uso del Trastuzumab, anticuerpo monoclonal humanizado desarrollado contra este factor de membrana. Este anticuerpo

monoclonal supone un cambio conceptual en el tratamiento de los tumores sólidos, constituyendo la primera terapia dirigida específicamente contra las células tumorales y sin efecto sobre las células normales con verdadera eficacia clínica. No sólo es importante por ser en sí mismo una diana terapéutica; diversos trabajos sugieren que la amplificación del HER2 está relacionada con la resistencia a tratamientos quimio/hormonales en el cáncer de mama avanzado.

El “Gold Standard” para la determinación de sobreexpresión del HER2 en cáncer de mama es el FISH (Hibridación in situ fluorescente). Dicha técnica detecta directamente la amplificación del gen. Actualmente se acepta la técnica DISH (hibridación in situ cromogénica y con plata) con una sensibilidad y especificidad similar a la FISH. La detección de la proteína HER2 por inmunohistoquímica (Herceptest®; se divide el resultado en 4 grupos de expresión: 0-1-2-3) por anatomopatólogos expertos presenta una correlación mayor al 90% con el FISH o DISH.

Catepsina D: Es producida y secretada por las células tumorales mamarias. Su sobreexpresión está asociada a mayor agresividad del tumor y menor tiempo libre de la enfermedad. Brouillet y col. estudiaron la relación entre catepsina D, la proteína HER2 y la amplificación del oncogén c-myc, encontrando que no se relaciona con la expresión del HER2, pero si con la amplificación del oncogén c-myc.

Índice de proliferación celular Ki-67: El anticuerpo monoclonal Ki-67 reconoce un antígeno presente en las fases G1, S, G2 y M del ciclo celular; en la fase G0 y comienzo de la fase G1, periodos de reposo, no se detecta este antígeno. Este antígeno permite identificar las células proliferantes dentro del tumor y la positividad se correlaciona con el grado de diferenciación tumoral, invasión vascular, metástasis a ganglios linfáticos y es inverso a la existencia de receptores hormonales.

Gen p53: La p53 es una proteína oligomérica que se une al DNA cuya función es desencadenar respuestas celulares al daño del DNA. No están completamente descritos los mecanismos, pero en general se acepta que su actividad conduce a 3 tipos de respuesta: disminuye la velocidad de la transición de las fases de la replicación celular, activa sistemas proteicos encargados de la reparación del DNA y si el daño del DNA es crítico activa la apoptosis.

Cuando el gen de la p53 se halla mutado existe mayor inestabilidad genética debido a que la replicación celular no tiene freno, se dispone de menos tiempo para reparar el DNA en cada ciclo celular, y la respuesta apoptótica al daño genómico está inhibida. La sobreexpresión de p53 en la célula mamaria maligna se ha relacionado con peor pronóstico y peor respuesta a la quimioterapia y a la hormonoterapia. Sin embargo, los análisis inmunohistoquímicos todavía no pueden determinar si el aumento de la p53 detectado se debe a un incremento de su transcripción como respuesta a un estímulo proapoptótico o a que existe una p53 mutada y por tanto poco eficaz. Así, si bien es posible que en los próximos años las tasas de p53 en tumor primario decidan un tipo de tratamiento u otro, de momento no se ha incorporado su estatus al árbol de decisiones terapéuticas.

uPA/PAI: El activador del plasminógeno tipo uroquinasa (Upa) y su inhibidor PAI-1, han demostrado un poder predictivo positivo significativo, con especial utilidad en el grupo de ganglios linfático negativos. Los niveles altos (medidos sobre extractos tisulares mediante técnicas de ELISA) indican un alto riesgo de recidiva y la necesidad de adyuvancia, mientras que si permanece bajo el pronóstico es excelente y podrá ahorrarse el tratamiento sistémico. El principal problema metodológico para su valoración, es la necesidad de al menos 300 mg de tejido tumoral fresco/congelado para su determinación, cantidad consideraba que impide su implantación como una herramienta de rutina. El valor predictivo de este marcador podría ser mayor si se mejoraran sus métodos de detección, ya fuera por micro-ELISA, inmunohistoquímica o sobre tejido fresco obtenido de biopsia, trucut o PAAF.

Susceptibilidad genética: En el año 1994 se clonó el gen BRCA1, tras identificar en 1990 una región de susceptibilidad genética al cáncer de mama en la región 17q21. Las mutaciones de dicho gen (transmitido de forma autosómica dominante) se asocian a un riesgo de hasta 85% de desarrollar cáncer de mama a lo largo de la vida, sobre todo a edades tempranas. Asimismo, también la posibilidad de padecer cáncer de ovario aumenta si esta mutación está presente.

En ese mismo año se localizó y clonó el BRCA2, en el cromosoma 13 (Transmisión autosómica dominante). El riesgo estimado de padecer cáncer de mama es similar para las pacientes que presentan mutaciones en este gen, si bien la posibilidad de padecer cáncer de ovario es menor. Las proteínas derivadas de la transcripción de los genes BRCA1 y BRCA2 ejercen una función inhibitoria de las señales desencadenadas por las hormonas esteroideas en el epitelio mamario; hipotéticamente, una alteración en la función de dichas proteínas provocaría una falta de control sobre los caminos de señalización celular derivados de la activación estrogénica, predisponiendo a la carcinogénesis.

Las pacientes con los síndromes de Li-Fraumeni, Cowden, Muir-Torre y con la enfermedad ataxia-telangiectasia, tienen también un aumento de la susceptibilidad al cáncer de mama; este aumento está relacionado con un deterioro en la capacidad de reparación del DNA a nivel de todos los tejidos, no tratándose por tanto de síndromes específicos de cáncer de mama. La implicación pronóstica y predictiva de este grupo de tumores se basa en que los tumores con mutación BRCA-1 suelen tener problemas de diferenciación y son RE, RPg y HER2 negativos, con un fenotipo basal, EGFR positivos, con escaso componente de carcinoma *in-situ* e hipersensibles a esquemas de tratamiento basados en platino e inhibidores de PARP-1.

Perfiles genéticos en el cáncer de mama: Las pacientes con características clinicopatológicas similares y que tienen evoluciones completamente diferentes,

nos sugiere que deben existir características moleculares subyacentes que determinen el comportamiento tumoral.

Un grupo de investigadores del *MD Anderson Cancer Center* el año 2003 presentaron en la sesión plenaria del simposium anual de la ASCO un trabajo importante en el terreno de la predicción de eventos en el cáncer de mama: utilizando la tecnología de Micro-Arrays de cDNA, sometieron material tumoral fresco procedente de la lesión primaria a un estudio genético masivo. Con esta tecnología se puede analizar la expresión cuantitativa individual de unos 30000 genes diferentes, a pesar de que no se conozca la función de cada uno. Se estratifica cada gen individualmente por encima o por debajo de un punto de corte de referencia para aumento de expresión o represión de la misma, obteniendo finalmente el perfil de expresión génico de dicho tumor en concreto. Así diferentes grupos trabajan en ello como:

- *Netherlands Cancer Institute*, con MAMMAPRINT, compuesto por 70 genes y aprobado por la FDA para su comercialización desde el 6 de febrero del 2007, siendo el primer mamochip autorizado.
- Grupo Rotterdam, con AFFYMETRIX, compuesto por 76 genes seleccionados entre miles ya estudiados, con lo cual las pacientes con cáncer de mama en estadios iniciales son clasificadas en alto o bajo riesgo de enfermedad metastásica en el futuro.
- ONCOTYPE DX, este método se basa en la RT-PCR, y el cual se encuentra validado para su utilización.

Vemos que poco a poco los métodos bioquímicos son reemplazados por la inmunohistoquímica y la biología molecular. En el futuro la biología molecular y la bioinformática mediante los chips activados por la hibridación del DNA tumoral o de los DNA complementarios de los RNA mensajeros tumorales, serán las bases de los estudios en el cáncer de mama. Pero mientras esto llega el papel de los factores pronósticos clásicos sigue siendo crucial para la

clasificación y el manejo terapéutico de las pacientes con cáncer de mama.

2.6 Citoqueratinas (CK)

Las citoqueratinas (CKs) constituyen el mayor subgrupo de proteínas de filamentos intermedios, siendo una familia multigénica con más de 20 tipos diferentes de polipéptidos, los cuales se dividen en tipo ácido I (CK9-CK20) y básico de tipo II (CK1-CK8). En las células de epitelio normal se observa la expresión por menos de un Citoqueratina de ambos grupos. Las citoqueratinas (CK), hacen parte del cito esqueleto de las células epiteliales, donde su función principal es la de mantener la integridad de estas células. Sin embargo, pueden desempeñar funciones en mecanismos de señalización celular, respuestas al estrés y la apoptosis. CK se someten a una regulación compleja que implica modificaciones posteriores a la traducción e interacciones con uno mismo y con diversas clases de proteínas asociadas. (84)

2.6.1 Citoqueratina 19 (CK19)

La CK19, uno de las tres queratinas principales junto a CK8 y CK18 se expresan en el epitelio simple o estratificado y en diversos carcinomas incluyendo el cáncer de mama, donde se ha utilizado para la detección de células de cáncer de mama en los tejidos mesenquimales y parece ser el marcador tumoral más sensible y fiable en los pacientes con cáncer de mama metastásico y en fase inicial. Este se sobre expresa en células de carcinoma, lo cual lo presenta como un prometedor marcador en la detección precoz de cáncer de mama(85,86)

La CK19, cuenta con un peso molecular de 40 kDa, fue detectada por primera vez, en una la línea celular de carcinoma escamoso y luego se identificó en células meso-epitelial y células epiteliales no queratinizadas. Normalmente, CK19 no se expresa en tejido queratinizado estratificado y tejido epitelial escamoso, tal como en la epidermis, la encía y el paladar duro. Sin embargo, CK19 se expresa en la capa de células basales de tejido epitelial bucal no queratinizado. La CK19 se ha utilizado como un marcador de células epiteliales en circulación para el

diagnóstico de la metástasis del cáncer, ya que es probablemente una de las marcadores más adecuados para el cáncer.(12)

2.7 Mamaglobina (hMAG)

La Mammaglobin es una glicoproteína de 93 aminoácidos, con homología con a la familia secretoglobin-uteroglobina, hasta el momento no se le asocia función, sin embargo su expresión se restringe a la glándula mamaria, es así como hMAG miRNA, se ha detectado en altos niveles (10 veces mayor) en líneas tumorales mamarias, al ser comparados con los niveles de expresión en tejido mamario sano; esta sobreexpresión es asociado a cáncer de mama e independiente al tipo histológico, incluso en tumores primarios. Por lo que se ha postulado su empleo como un biomarcador restringido el cáncer de mama, siendo aplicable mediante cribado diferencial. También hay informes que exploran mammaglobin como un marcador en suero para el cáncer de mama, aunque los datos se han acumulando sobre la utilidad clínica de mammaglobin como un biomarcador para fines de diagnóstico, son pocos , estos se han centrado en su utilidad en la identificación de cáncer metastásico de mama.(85–88)

Adicionalmente, se ha empleado para la diferenciación de subtipos carcinomas de mama: Luminal A y B, HER2, basal like, el carcinoma (BLC), y triple negativo no clasificados carcinoma (UTNC) por perfiles de inmunohistoquímica sustitutos establecidos.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer de mama es la patología (tipo cáncer) de mayor incidencia y mortalidad en mujeres alrededor del mundo, considerándosele un problema sanitario y social de primer orden. A pesar de ser identificado se estima que aproximadamente la mitad de las pacientes con cáncer de mama localizado y tratadas con cirugía radical sufrirán una recidiva, en ellas la metástasis y la invasión axilar son la principal causa de morbo-mortalidad relacionada con el cáncer de mama.

La identificación de la patología requiere estudios histológicos, donde la biopsia del ganglio centinela se utiliza para decidir el tratamiento a seguir, el cual podría incluir la linfadenectomía axilar en los casos de carcinomas en estados avanzados. Si bien existe cultura de autoexamen y mamografía en la población, esta primera permite la detección en estados avanzados donde la remoción de tejido mamario es mayor, y donde el pronóstico de sobrevida es menor, al ser comparado con aquellas pacientes donde se identifican micrometástasis. La detección temprana favorece la sobrevida, sin embargo cuenta con limitantes, como acceso a exámenes y formación (experiencia) del patólogo, esta última juega un rol definitivo en dictamen; a lo cual se suma tiempo de diagnóstico y costos asociados a el tiempo de intervención del paciente. Por lo cual se requiere el desarrollo de técnicas que permitan la detección efectiva de los casos de micrometástasis, en tiempos mínimos, sin requerir intervenciones prologadas en los pacientes y de fácil aplicación, que permitan un diagnóstico efectivo en personal (patólogo) con poca experiencia.

Diversos estudios señalan la posible implementación de marcadores moleculares en el diagnóstico de patologías, como es el caso de la mamaglobina y CK19, por lo que surge la interrogante acerca de la utilidad de estos genes como marcadores de micrometástasis en el estudio del ganglio centinela, así como su factibilidad diagnóstica y aplicabilidad durante el tiempo quirúrgico, en busca de evitar re intervenciones e impactar en el pronóstico de la enfermedad.

4. JUSTIFICACIÓN

La biopsia selectiva del ganglio centinela es el procedimiento de elección para la estadificación axilar del cáncer de mama, y permite seleccionar un subgrupo de pacientes en los que la linfadenectomía axilar no aporta ningún beneficio adicional, pero si efectos secundarios indeseables. (19)

El uso de la biopsia selectiva del ganglio centinela se ha extendido desde la descripción de la técnica para el melanoma en la década del 90, evidenciándose su utilidad. (9)

En los últimos años los cambios conceptuales introducidos por ensayos clínicos y estudios observacionales han producido, una gran disparidad de criterios respecto a la actitud terapéutica frente al diagnóstico del ganglio centinela metastásico.

Ello justifica la necesidad de estudiar técnicas moleculares que permitan el diagnóstico rápido, oportuno, confiable, con buenos valores predictivos positivos y negativos, con alta sensibilidad y especificidad todo esto durante el tiempo quirúrgico, lo cual busca disminuir la ansiedad de las pacientes, las re intervenciones, el retraso en el tratamiento quirúrgico cuando se requiera la linfadenectomía y el sobrecosto que esto acarrea al sistema de salud.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar la metodología y la técnica molecular empleando la expresión de CK19 y mamaglobina, para el estudio de biopsias de ganglios centinela en cáncer de mama temprano (hasta 3 cm) y evaluar su valor pronóstico.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar el ganglio centinela mediante la coloración de hematoxilina y eosina e inmunohistoquímica.
- Evaluar la expresión de los genes CK19 y mamaglobina, en los ganglios centinelas extraídos intraoperatoriamente mediante RT-PCR y qPCR.
- Valorar la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo de la técnica RT-PCR para el ganglio centinela.
- Determinar el valor pronóstico del análisis mediante RT-PCR en la relación con la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad.
- Analizar si el estudio del ganglio centinela mediante RT-PCR presenta valor pronóstico independiente.

6. METODOLOGÍA

6.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

El estudio realizado correspondió a un estudio descriptivo longitudinal. Las pacientes estudiadas fueron diagnosticadas con cáncer de mama en estadios I y II (hasta 3 cm), y candidatas a la técnica del ganglio centinela, los ganglios fueran evaluados durante el acto intraoperatorio con H&E, realizando improntas citológicas y/o biopsia por congelación, también se les realizaba la técnica de inmunohistoquímica (IHQ) con Citoqueratina AE1-AE3 según los protocolos establecidos por el colegio americano de patólogos (CAP). Con estas condiciones se estandarizo la técnica de RT-PCR y qPCR en busca de metástasis intraoperatoria o post-operatoria en material congelado durante este periodo.

Periodo del estudio

El estudio se realizó durante 6 años en el periodo comprendió entre Octubre del 2004, a Marzo del 2010 donde se recolectaron las muestras a estudiar y se congelaron a menos 80 grados centígrados para la posterior extracción de RNA.

6.1.2 Población de estudio y tamaño de la muestra

Se estudiaron 301 pacientes que fueron diagnosticadas de cáncer de mama invasor o micro invasor y se les realizó la técnica del ganglio centinela. La clasificación de las pacientes se basó en el sistema internacional TNM.

6.1.3 Criterios de exclusión

No se incluyeron pacientes en que la técnica del ganglio centinela no fue satisfactoria, cuando falló la sonda portátil o en aquellas que poseían más de 3 ganglios centinelas.

6.1.4 Criterios de inclusión

Se incluyeron en el estudio todas las pacientes a las que se les realizó la técnica del ganglio centinela en el Hospital Clínico San Carlos (HCSC), durante el periodo de Octubre 2004 a Marzo del 2010. Estas pacientes recibieron cirugía conservadora o radical, con buena migración del marcador durante la determinación del ganglio centinela. (**Tabla 9**)

Tabla 9. Criterios de inclusión de pacientes con cáncer de mama según protocolo del HCSC

-
1. Pacientes con diagnóstico de cáncer de mama invasor o micro invasor
 2. Pacientes diagnosticadas y tratadas en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid
 3. Periodo del estudio
 4. Tamaño del tumor hasta 3 cm de diámetro
 5. Ganglio linfático negativo clínicamente
 6. Biopsia intraoperatoria del ganglio centinela con estudio de H&E e IHQ
 7. Migración satisfactoria del radioisótopo
 8. Consentimiento informado autorizado
-

6.3 PROCEDIMIENTO REALIZADO

La técnica incluyó la determinación del ganglio centinela por medicina nuclear, la extracción por cirugía mamaria, el estudio en el laboratorio de anatomía patológica de la biopsia del ganglio centinela y el transporte del fragmento del ganglio linfático en una solución de guanidina (RNA STAT-60), su almacenamiento a - 80°C y la realización de la técnica de RT-PCR y qPCR en el Laboratorio de Genómica.

6.3.1. Metodología clínica

6.3.1.2 Etapa preoperatoria

Historia clínica

Las variables estudiadas en la historia clínica fueron. (**Tabla 10**)

Tabla 10. Variables estudiadas en la historia clínica

-
- Edad, antecedentes personales, antecedentes familiares y obstétricos
 - Fecha de la cirugía
 - Resultado de la RT-PCR para Mamaglobina y CK19
 - Resultado de H&E e IHQ
 - Número de ganglios centinelas estudiados y tamaño de las metástasis en el ganglio centinela
 - Linfadenectomía y número de ganglios positivos en la linfadenectomía
 - Tamaño del tumor, grado tumoral y tipo histológico
 - Estadío según la clasificación internacional TNM
 - Receptores hormonales de estrógenos y progesterona
 - Índice de proliferación celular Ki-67
 - Gen HER2 y BRCA
 - Tratamiento prequirúrgico y postquirúrgico
 - Recidiva, fecha de la recidiva y lugar anatómico de la recidiva
 - Muerte, fecha de la muerte y causa de la muerte
-

Localización del ganglio centinela: El día previo a la cirugía (18 a 24 horas) se realizó la inyección con ^{99m}Tc en el servicio de medicina nuclear, con una dosis de 0.1 mCi de ^{99m}Tc en la región periareolar e intradérmica, posterior se realizó gammagrafía de comprobación a las 16-18 horas tras la punción, comprobando la migración del coloide hasta la axila y el conteo del número de ganglios centinelas.

Trazador: En España los radiotrazadores utilizados con mayor frecuencia son el

nanocoloide de albúmina, el coloide de estaño y el sulfuro de renio. Existe un acuerdo general por el que el tamaño de partículas varía entre 50-200 nm para una óptima localización del ganglio centinela, existiendo un compromiso entre la rapidez del drenaje linfático y una retención adecuada del radiotrazador en el ganglio centinela.

La dosis varían entre 18.5-111 MBq (0.5-3 mCi) en función del tiempo transcurrido hasta la intervención quirúrgica. El volumen administrado varía entre 0.2 y 3 ml. La vía de inyección del radiotrazador es preferiblemente intratumoral o peritumoral, aunque las inyecciones peri areolares y/o subdérmica son una opción correcta.

La inyección subdérmica sobre el tumor es suficiente en todos los casos con excepción de los tumores profundos o no palpables, en estos se recomienda una inyección peritumoral guiada por ecografía o la periareolar y posterior a la inyección del radiotrazador un ligero masaje sobre la zona. (Figura 1 y 2)

Se utilizó un colimador de baja energía y alta resolución: ventana de 15 a 20% en el fotopico de 140 keV. Matriz de 256 x 256 para imágenes estáticas y de 128 x 128 en las imágenes tomogammagráficas.

Las imágenes estáticas se tomarán a los 30 minutos y 2 horas de la inyección del trazador, en proyecciones anteriores y oblicuas a 45 grados o con movilización de la mama hacia la línea media y lateral con 180-300 segundos por imagen.

Se debe realizar otras proyecciones siempre que se considere necesario, así como controles posteriores hasta el momento de la intervención quirúrgica si es necesario. Para delimitar los contornos corporales puede utilizarse una fuente rectangular (^{57}Co o $^{99\text{m}}\text{Tc}$) o trazar los límites anatómicos con un puntero ^{57}Co o $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

En gammacámaras híbridas con Tc, se adquieren 120 imágenes de 15 a 20 segundos cada una, realizando una órbita de 360 grados en matriz de 128 x 128.

Estas recomendaciones son orientativas según el cirujano. (Figura 3 y 4)

La localización del ganglio centinela puede marcarse en la piel, especialmente en la proyección oblicua a 45 grados mediante el puntero de ^{57}Co o $^{99\text{m}}\text{Tc}$, en caso de visualización del ganglio centinela en la cadena mamaria interna la proyección anterior es la idónea para marcar la localización del ganglio centinela.

En las proyecciones planares se puede modificar el brillo y contraste para la optimización de la imagen.

Si se realiza el estudio con imágenes planares y/o SPEC-TAC en diferentes tiempos, la primera imagen activa detectada en la región linfática definida debe considerarse como el ganglio centinela. (Figura 5 y 6)

No obstante, el criterio principal es la visualización de un canal linfático hacia el ganglio centinela. Además se debe analizar diversas zonas linfáticas y en diferentes estudios temporales para valorar la posible presencia de ganglios centinelas de aparición asincrónica.

El estudio se presenta en placa o imagen en papel para las imágenes estáticas así como para la reconstrucción tomográfica si se realiza con SPECT-TC.

6.3.2. Etapa operatoria

Cirugía

Esta se realizó en la unidad de Cirugía de mama del HCSM donde se empleó una sonda portátil en la cirugía, con la cual se localizó el ganglio centinela y se realizó el conteo y comparación de los puntos de inyección del marcador y con el lecho quirúrgico, y se determinó si correspondía a las características de un ganglio centinela. Al finalizar la extirpación de los ganglios centinelas, el contaje fue mínimo o insignificante menor del 10% de los puntos de inyección.

Para la localización se realizó una punción intraparenquimatosa en el cuadrante supero externo de la mama, se utilizaron 1-3 ml de azul de isosulfan, (azul patente o azul de metileno) y se procedió a masaje por 10 minutos.

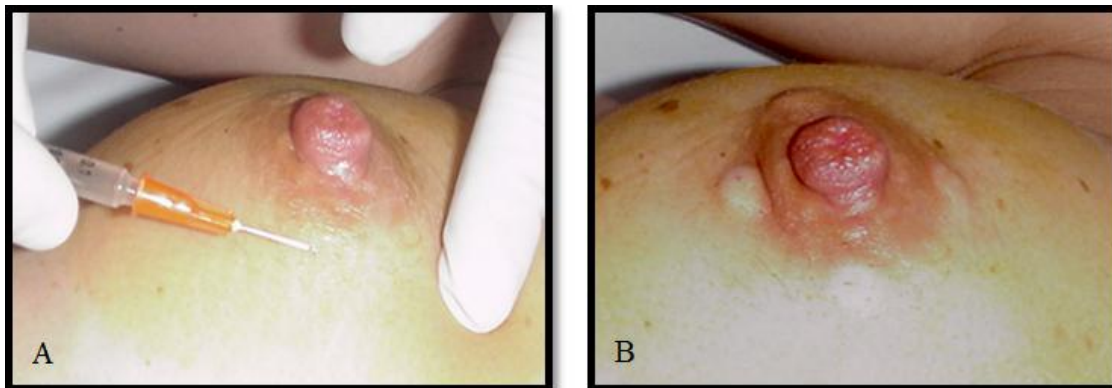


Figura 1. Punción intraparenquimatosa con azul de isosulfan

En la figura 1 se observa la punción subareolar en medicina nuclear (A), se aplicaron 4 dosis intradérmicas de ^{99m}Tc , 0.4 mCi (3.7MBq) entre 18 y 20 horas previo a la cirugía (B).

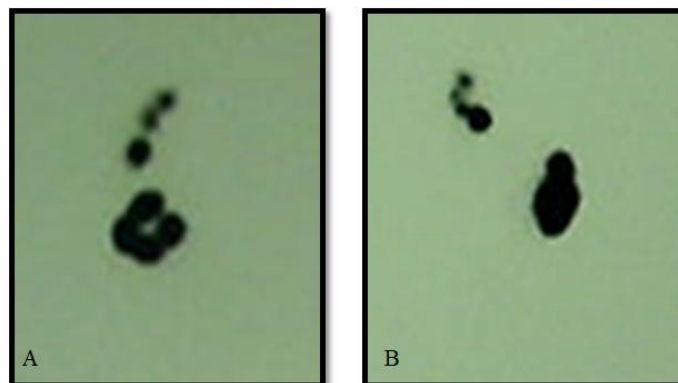


Figura 2. Linfocintigrafía

En la figura 2 se observa en (A) la visión anterior y (B) la visión posterior, se reconocen los 4 puntos de inyección y se detectan 3 ganglios linfáticos centinela.

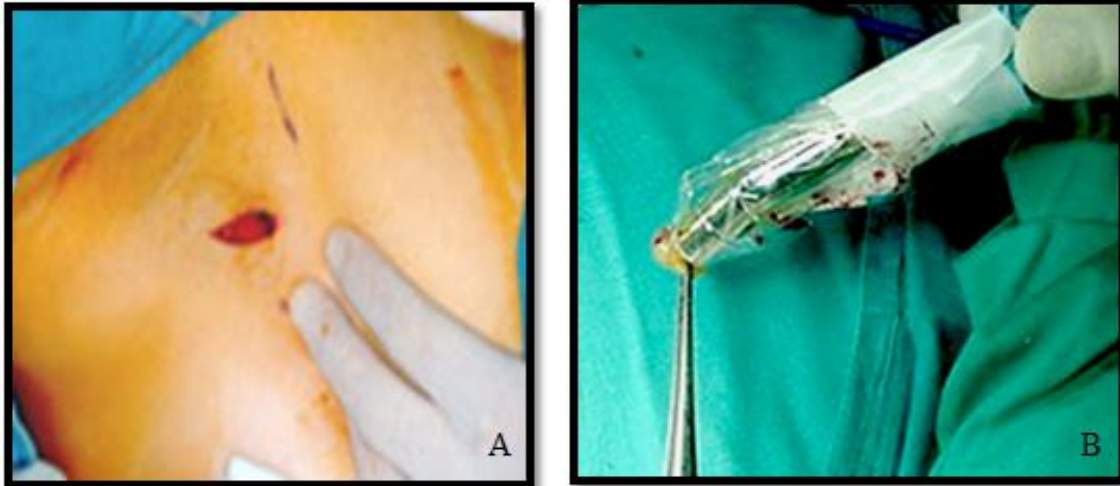


Figura 3. Técnica quirúrgica del ganglio centinela

En la figura 3 se observa el procedimiento con el cual se localizaba del ganglio linfático centinela en cirugía (A) y donde se realizó la incisión en la zona de mayor radiactividad (B). La sonda de gammagrafía guía la disección.

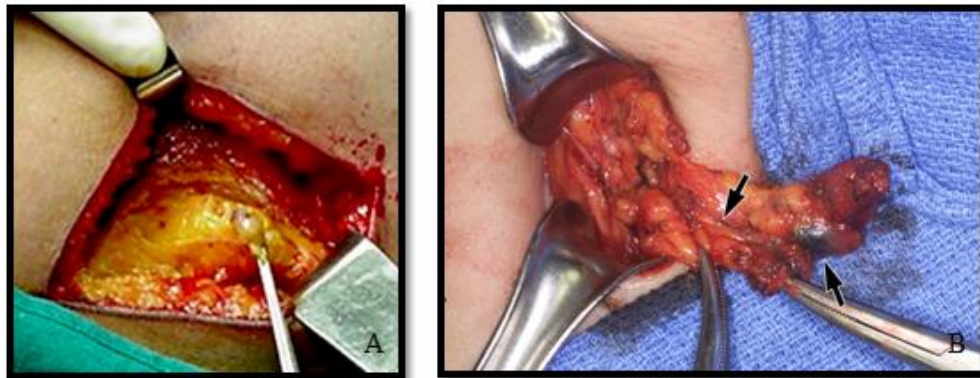


Figura 4. Técnica quirúrgica del ganglio centinela

En la figura 4 se observa la localización quirúrgica del primer ganglio centinela (A) y (B) se observa el vaso linfático. Nivel uno de la estación ganglionar axilar.

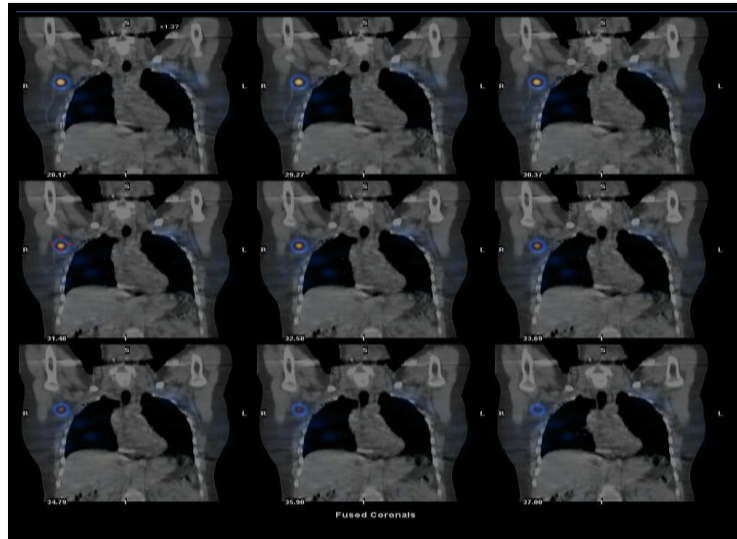


Figura 5. SPECT-TAC permite la localización exacta de todos los ganglios linfáticos centinela determinando su número con mayor sensibilidad.

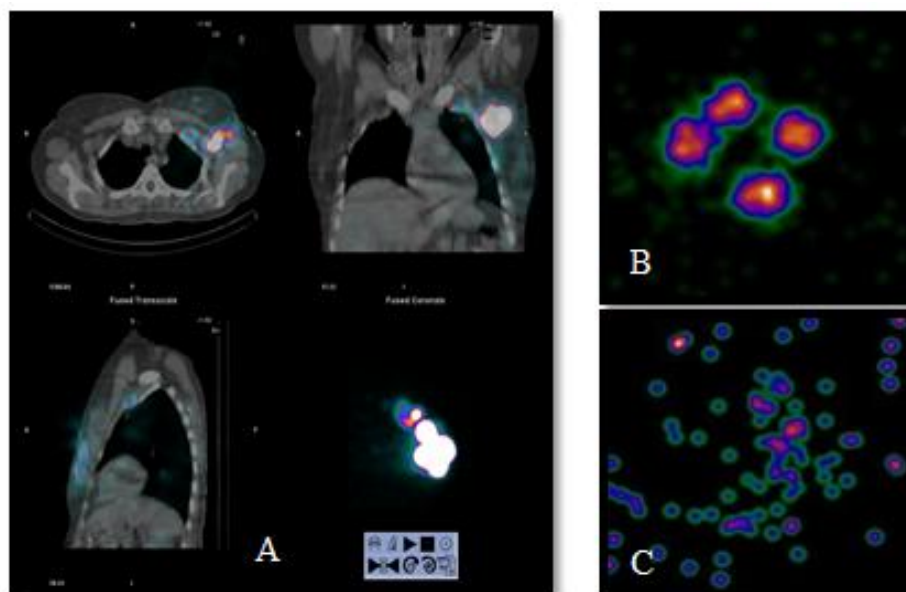


Figura 6. Técnica con gamacamara, localización de 4 ganglios centinela en la región axilar (A y B) y posterior linfadenectomía con negatividad del lecho quirúrgico (C)

6.3.3 Metodología analítica

Técnica de Laboratorio de Anatomía Patológica y Patología Molecular

Los ganglios centinelas fueron enviados al Laboratorio de Anatomía patológica, donde se distribuyó en fracciones de un 50% a 75% para análisis histopatológicos y entre un 25% a 50% para la técnica molecular, este se depositó y transportó en solución de guanidina (RNA STAT-60) al laboratorio de genómica y se almacenaron en el Biobanco (Figura 8). Los fragmentos empleados para análisis histopatológicos se realizaron según los procedimientos estándares (Congelación, impronta, coloración de H&E e IHQ). Cada ganglio linfático se cortó en dos o más partes entre 1.5 y 3 mm de diámetro, en los casos donde el tamaño del espécimen lo permitió. (Figura 7)

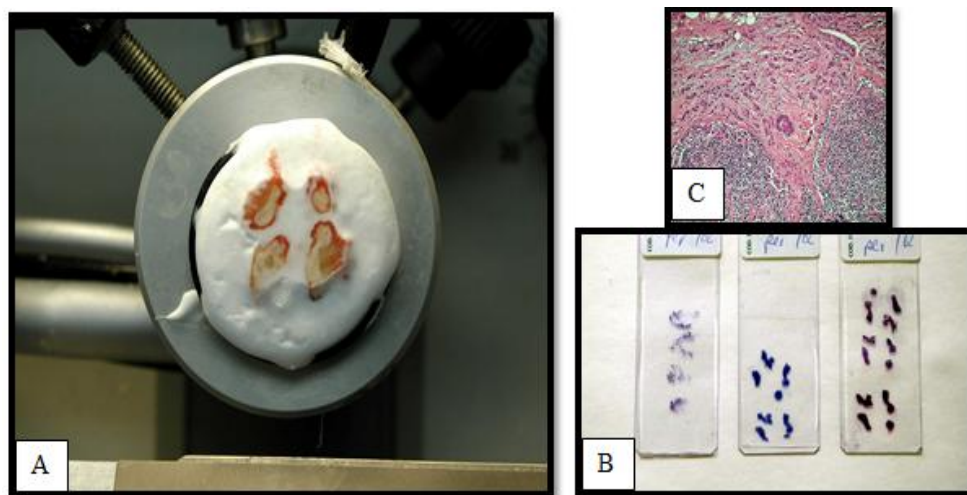


Figura 7. Técnica del ganglio centinela, cortes por congelación

Biopsia por congelación de los ganglios centinela incluidos en OCT (A), cortes a 4 micras y coloración convencional con H&E e impronta (B y C).

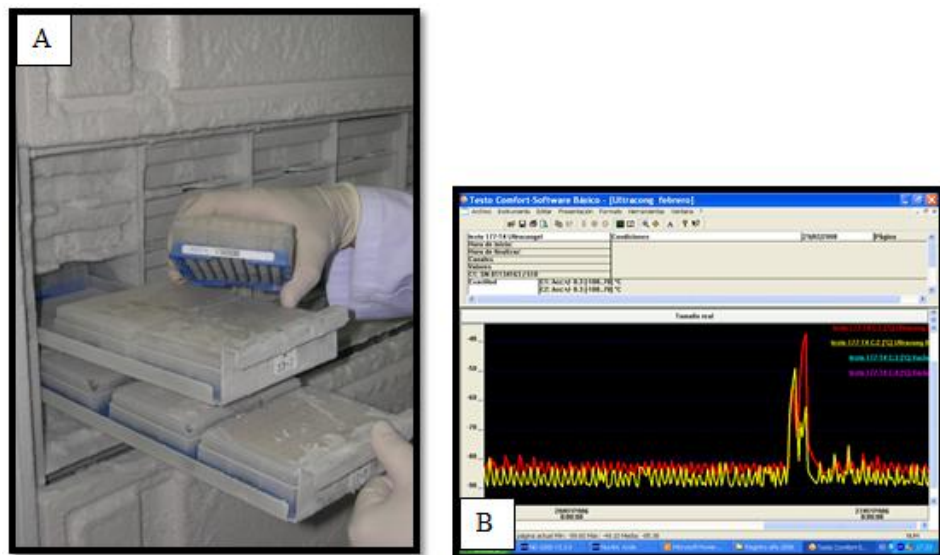


Figura 8. Biobanco del Laboratorio de Genómica

Biobanco donde se preservaron los ganglios linfáticos a -80°C en solución RNA STAT-60 (A) y software de control de temperaturas del Biobanco (B).

Determinado que el ganglio centinela era negativo en el laboratorio de anatomía patológica, este fragmento o fragmentos del ganglio centinela fueron fijados con formalina y posteriormente incluidos en bloques de parafina. Una vez en estos bloques se realizaron un mínimo de 6 niveles por bloque para coloración de H&E y otros seis niveles de este bloque para realizar el estudio de inmunohistoquímica (IHQ) con Citoqueratina AE1-AE3 según los protocolos estándares. (Figura 9)

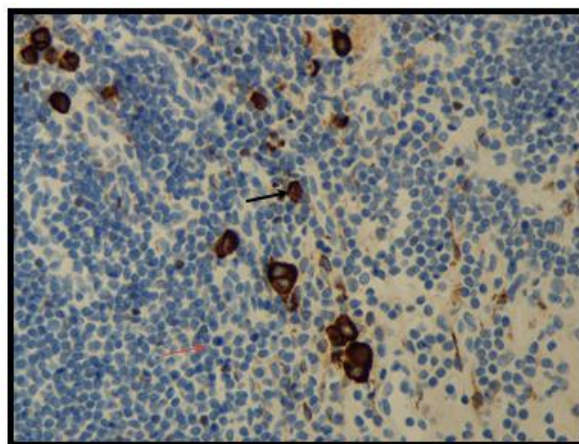


Figura 9. Estudio de inmunohistoquímica del ganglio centinela

Células tumorales aisladas determinadas por inmunohistoquímica (IHC) con Citoqueratina AE1-AE3.

El informe de Anatomía Patológica incluía variables determinadas según el colegio americano de patólogos (CAP) como:

- Tamaño del tumor
- Uni o multicéntrico
- Tipo histológico
- Presencia o ausencia del componente intraductal, porcentaje sobre el total del tumor, grado histológico y nuclear
- Estado de los márgenes
- Estado de la piel y músculos profundos
- Invasión vascular y neural
- Número de ganglios linfáticos
- Técnica de IHQ, receptores hormonales, Ki-67 y oncogén HER2

6.4.1 Técnica de Biología Molecular

Se determinó en el posquirúrgico la positividad o negatividad de 202 pacientes, utilizando la técnica manual con el *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) y PCR para Citoqueratina 19 y Mamaglobina.

Posterior a la estandarización por PCR de los primers, técnica y metodología, se realizó la determinación intraoperatoria a través del diseño realizado en conjunto para kit GeneSearch™ Breast Lymph Node (Veridex) con la técnica de qPCR, este resultado se obtuvo en 20 minutos con 99 pacientes de la serie.

El grupo control fueron las pacientes a las que sin tumor se les realizó una mastectomía profiláctica y técnica del ganglio centinela, por ser portadoras de la mutación BRCA1 o BRCA2 o por riesgo de presentar cáncer de mama en la mama contralateral, siendo esta mama negativa para malignidad.

Los controles positivos fueron aquellas pacientes que durante el tiempo quirúrgico

del ganglio centinela fue determinado positivo por H&E en el laboratorio de Anatomía Patológica. Los marcadores utilizados fueron dos genes Mamaglobina y Citoqueratina 19.

ANÁLISIS MOLECULAR

Extracción de RNA

La extracción del RNA de cada una de las muestras se realizó siguiendo las indicaciones del *RNeasy Mini Kit* (Qiagen). Brevemente en un volumen de etanol al 70% era añadido al tejido y posteriormente homogeneizado por medios mecánicos. La mezcla es adicionó a una columna para centrifugar a 8.000 g durante 30 segundos. El RNA adherido a la membrana de la columna y se eluyó en 50 µl de agua libre de RNAsas. (Figura 10)



Figura 10. Manejo de las muestras para obtener RNA de buena calidad y estudio de su integridad con gel de agarosa

La integridad del RNA se evaluó en gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes al 1%. Solo las muestras que presentaban las bandas 28S y 18S del RNA ribosómico fueron usadas en las técnicas de RT-PCR y qPCR. (Figura 11)

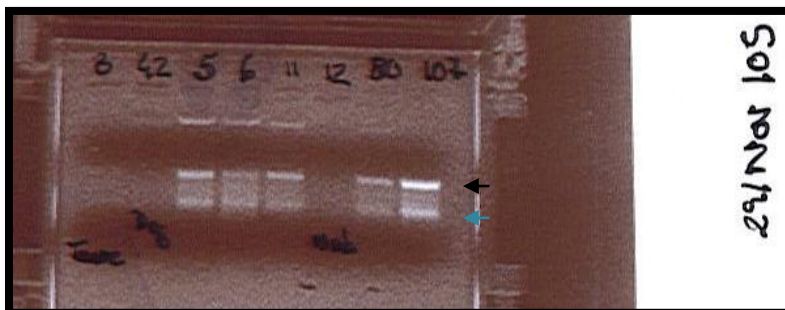


Figura 11. Evaluación de la integridad del RNA con la determinación de las bandas 28S y 18S del RNA ribosómico.

En la figura 11, se observa en la parte superior el código de las muestras evaluadas (en orden 3, 42, 5, 6, 11, 12, 80 y 107) la integridad del RNA para lo cual se observan los RNA 28S (flecha negra y 18S flecha azul). Se observa la degradación del ARN en las muestras 3, 42 y 12.

Cebadores

Los cebadores empleados en el estudio fueron diseñados empleando la herramienta *Primer-Blast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) a partir de las secuencias NM_002276.4 (CK19) y U33147.1 (mamaglobina). Para la determinación de Mamaglobina y CK-19 se emplearon 5 µl de RNA. Los primers empleados en la qPCR y RT-PCR fueron: Sense 5'CAA ACG GAT GAA ACT CTG AGC AAT GTT GA y AntiSense 5'TCT GTG AGC CAA AGG TCT TGC AGA en el caso de la Mamaglobina y Sense: 5'AGA TGA GCA GGT CCG AGG TTA y AntiSense 5' CCT GAT TCT GCC GCT CAC TAT CA en la determinación de la CK19. En la amplificación se empleó una concentración final de 400 µM de dNTP y 0.6µM de cada uno de los primers. El análisis de los productos amplificados se realizó en un gel de poliacrilamida al 12 %. (Figura 12)

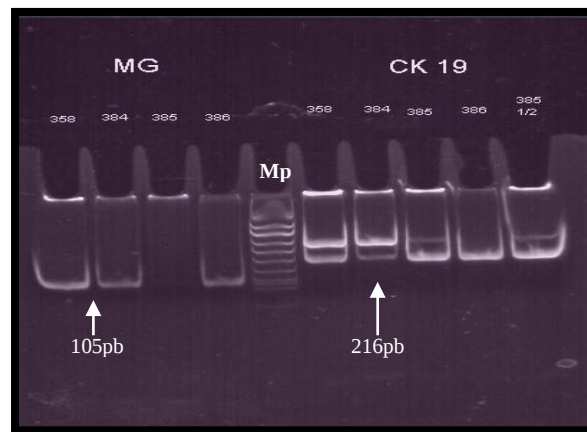


Figura 12. Gel de poliacrilamida para estudio por PCR del gen Mamaglobina y CK19

En la figura 12, se observa en los carriles 358, 384, 385 y 386 de la derecha, la banda de 105pb (flecha izquierda) correspondiente a Mamaglobina (MG), seguida del marcador de peso molecular (MP) de 1Kb con incremento de 50pb, seguidamente se observa en los carriles 358, 384, 385, 386 y 385 1/2, una banda de 216pb (flecha derecha) que corresponde a la Citoqueratina 19 (CK19)

Técnica para determinar Mamaglobina y Citoqueratina 19 (CK19) por qPCR utilizando GeneSearch™ Breast Lymph Node (Veridex) y Smart Cycler.

Para la determinación de Mamaglobina y CK-19 por qPCR en tiempo real, se empleó GeneSearch™ Breast Lymph Node (Veridex), este método fue diseñado para realizar la amplificación rápida de ácidos nucleicos y utilizar el RNAm procedente de los genes a estudiar. Mediante este kit desarrollado la determinación se realizó en 20 minutos.

La RT-PCR se realizó con una muestra de tejido fresco homogénea, se incluyeron tres marcadores de genes que son Mamaglobina, CK19 y un gen de control interno, el porfobilinógeno desaminasa PBGD, que se encuentra presente en todas las células "*Housekeeping gen*". La qPCR, así como la interpretación de los resultados, se llevó a cabo en el *Smart Cycler* siguiendo las indicaciones del protocolo ya validado.(Figura 13, 14 y 15)



Figura 13. Equipo de PCR en tiempo real. Laboratorio de genómica.

Equipo Smart Cycler para la realización de la RT-PCR y centrifugación de las muestras para evitar interferencias antes de iniciar el análisis de los genes Mamaglobina y CK19.

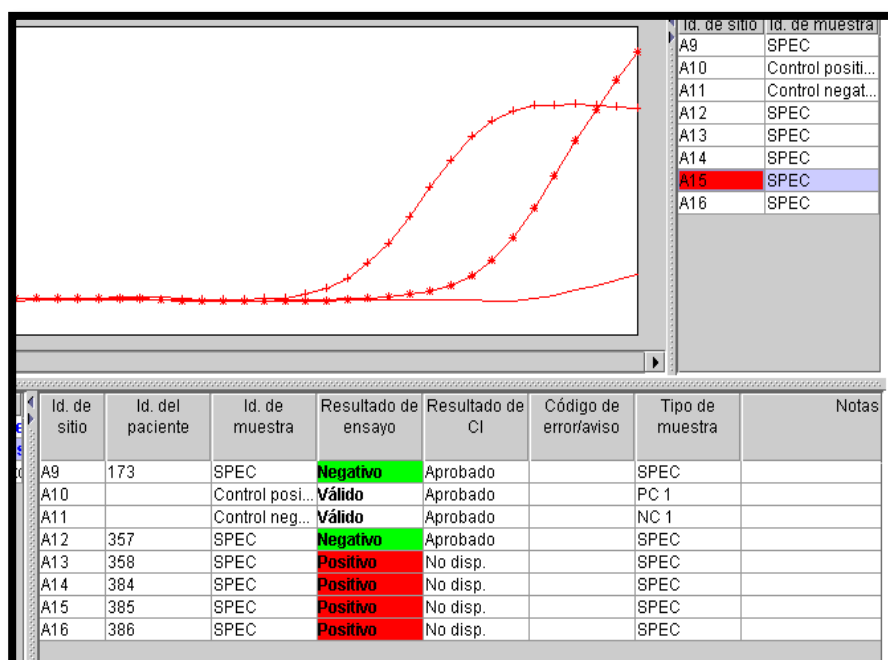


Figura 14. Se observa la curva de análisis del gen Mamaglobina

Se observa una muestra positiva por RT-PCR para el gen Mamaglobina y Negativa para el CK19, el gen control interno PBGB es positivo.

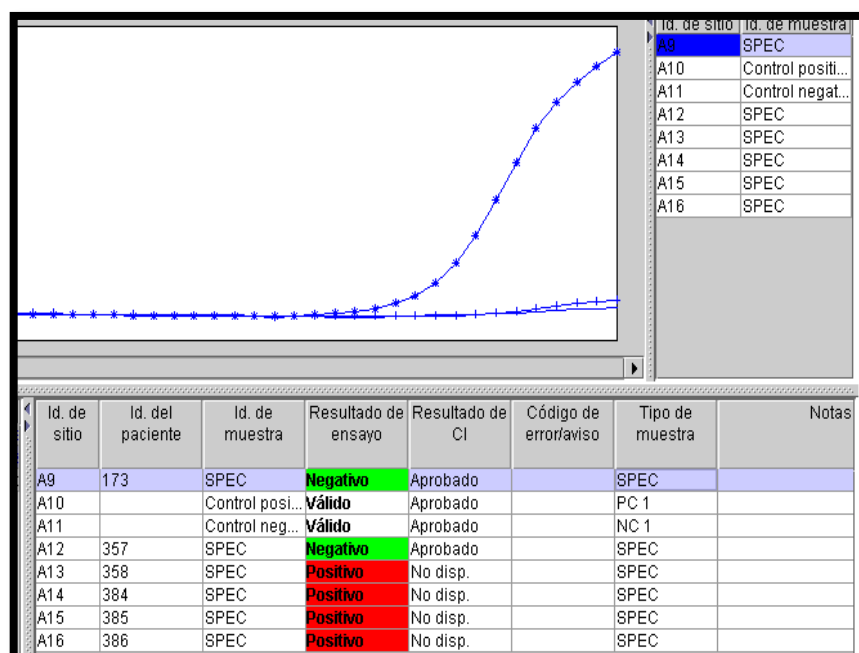


Figura 15. Se observa la curva de análisis positiva para el gen control

Se observa una muestra Negativa por RT-PCR para el gen Mamaglobina y Negativa para el CK19, el gen control interno PBGB es positivo.

Interpretación de la curva de RT-PCR:

Los valores umbral fueron determinados para reconocer metástasis mayores de 0.2 mm de diámetro así:

Mamaglobina: menor de 31

Citoqueratina 19: Menor de 30

PBGB: menor de 36

- Si el valor Ct de uno o ambos genes es inferior al valor umbral, la muestra es determinada positiva.
- Si el valor Ct de ambos marcadores genéticos es superior al valor umbral y el control interno inferior al valor umbral la muestra se determina negativa.
- Si el valor Ct del control interno es superior al valor umbral, se determina como no valido

- Si los controles externos no son validos, se determina todo el proceso de amplificación no valido, todas las muestras de la corrida deben ser repetidas

6.3.4 Metodología estadística

El análisis exploratorio de los datos se realizó mediante la construcción de tablas resumen para calcular medidas de ocurrencia y de asociación específicas tanto para Mamaglobina y CK19 por RT-PCR para esto se utilizó la prueba exacta de Fisher (89–91) con un nivel de significancia $p < 0.05$.

Se estimaron los índices de validez diagnóstica: sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN). Cada valor se determino con un nivel de confianza del 95%. Este análisis se realizo tanto para Mamaglobina por RT-PCR como para CK19 por RT-PCR tomando como prueba Gold estándar H&E y la combinación H&E+IHQ (92,93)

El análisis de supervivencia se hizo para Mamaglobina y CK19 por qPCR y RT-PCR, H&E y la combinación H&E+IHQ utilizando el estimador de Kaplan- Meier, para evaluar diferencias entre las curvas de supervivencia observada se utilizo el test de Log-Rank (94–96) El análisis estadístico fue realizado en el software STATA 12.0(97)

7. RESULTADOS

7.1 Descripción de la población

Los 301 ganglios centinelas se obtuvieron a partir de pacientes entre 57 ± 12 años; donde el 16.7% (50/301) fueron positivos para Mamaglobina, de las cuales el 38%(19/50) fueron mayores de 60 años, el 16%(8/50) presentaron antecedentes familiares de cáncer de mama, el 14% (7/50) tenían antecedentes oncológicos, el 30% (15/50) eran G0P0 positivas, donde el 98% (49/50) la cirugía corresponde a profilaxis y solo el 2% presentaron antecedentes genéticos. En este rango etario el 32.4%(12/37) fueron positivas CK19, de los cuales el 13.5%(5/37) presentaron antecedentes familiares de cáncer de mama, el 24.3% (9/37) presentaban antecedentes oncológicos, el 27% (10/37) fueron G0P0 positivas, donde el 97.5% (1/37) la cirugía corresponde a profilaxis, sin antecedentes genéticos. No se identificó asociación entre las características y la respuesta la expresión de Mamaglobina y CK19 (Tabla 11)

Tabla 11. Antecedes patológicos de los pacientes del estudio.

Característica	Mamaglobina					p	CK19				p
	Si		No		Si		No				
	(n=50)		(n=251)		(n=37)			(n=264)			
	n	%	N	%		n	%	n	%		
Edad (años)											
<30	0	0	3	1.2	0.46	1	2.7	2	0.8	0.17	
[31-40]	7	14	16	6.4		6	16.2	17	6.4		
[41-50]	10	20	57	22.7		8	21.6	59	22.3		
[51-60]	14	28	72	28.7		10	27	76	28.8		
>60	19	38	103	41		12	32.4	110	41.7		
A. familiares											
Mama	8	16	68	27.1	0.20	5	13.5	71	26.9	0.11	
O. Oncológicos	7	14	40	15.9		9	24.3	38	14.4		
No	35	70	143	57		23	62.2	155	58.7		
A. personales											
Mama	1	2	16	6.4	0.50	1	2.7	16	6.1	0.76	
O. oncológicos	2	4	15	6		1	2.7	16	6.1		
No	47	94	220	87.6		35	94.6	232	87.9		
A. genésicos											
G0P0	15	30	49	19.5	0.13	10	27	54	20.5	0.39	
Otros	35	70	202	80.5		27	73	210	79.5		

Profiláctica											
Si	49	98	250	99.6	0.31	36	97.3	263	99.6	0.23	
No	1	2	1	0.4		1	2.7	1	0.4		
BRCA											
Si	1	2	0	0	0.06	0	0	1	0.4	1.00	
No	2	4	3	1.2		0	0	5	1.9		
Sin dato	47	94	248	98.8		37	100	258	97.7		

En la tabla 11, n: Frecuencia absoluta, %: Frecuencia relativa (%), p: Valor p del test exacto de Fisher; A. corresponde a antecedentes y O. a otros.

7.2 Ganglio linfático

Del 54%(27/50) de los ganglios centinelas positivos para Mamaglobina, se observó metástasis >2.1mm en el 38.2%(13/50), y donde el 66% (33/50) de las participantes se les realizó linfadenectomía; obteniendo ganglios linfáticos resecados entre 4-9 en el 44%(22/50) de las pacientes. En contraste el 54%(20/37) de las pacientes positivas para CK19, el 40% (10/37), presentaron metástasis en el ganglio centinela >2.1mm y donde el 64.9% (24/37) se les realizó linfadenectomía; obteniendo ganglios linfáticos resecados entre 4-9 en el 43.2%(16/37) de las pacientes. Se observó asociación estadísticamente significativa ($p<0.01$) entre las pacientes positivas para Mamaglobina y CK19, y las variables descritas anteriormente (Tabla 12).

Tabla 12. Característica del Ganglio linfático.

Característica	Mamaglobina					CK19				
	Si (n=50)		No (n=251)		p	Si (n=37)		No (n=264)		P
	n	%	n	%		n	%	n	%	
Afectación ganglionar										
Si	27	54	20	8	<0.01	20	54.1	27	10.2	<0.01
No	22	44	231	92		17	45.9	236	89.4	
Sin dato	1	2	0	0		0	0	1	0.4	
Tamaño Metástasis										
<2mm	18	52.9	21	84	0.04	12	48	27	79.4	0.01
>2.1mm	13	38.2	4	16		10	40	7	20.6	
CTA	3	8.8	0	0		3	12	0	0	
Linfadenectomía										
Si	33	66	26	10.4	<0.01	24	64.9	35	13.3	<0.01
No	17	34	225	89.6		13	35.1	229	86.7	
Ganglios LFD										
0	17	34	225	89.6	<0.01	13	35.1	229	86.7	<0.01
1-3	8	16	8	3.2		6	16.2	10	3.8	
4-9	22	44	18	7.2		16	43.2	24	9.1	
10-15	3	6	0	0		2	5.4	1	0.4	

En la tabla 12, n: Frecuencia absoluta, %: Frecuencia relativa (%), p: Valor p del test exacto de Fisher; LFD: ganglios linfáticos resecados totales de la linfadenectomía

7.3 Características clínicas

A nivel histológico se observó que el 80% (40/50) ganglios centinelas presentaron carcinoma ductal, el 76 % (38/50) correspondieron a tumores entre 0.1 y 0.2 cm, y el 50% (25/50) estuvieron en estadio IIA. Respecto a los positivos para CK19, el 83.2% (31/37) presentaron carcinoma ductal, donde el 78.4 % (29/37) correspondieron a tumores entre 0.1 y 0.2 cm, y el 45.9% (17/37) se encontraban en estadio IIA. Se observó asociación estadísticamente significativa ($p < 0.01$) entre las expresión de Mamaglobina y CK19, y el estadiaje tumoral (Tabla 13).

Tabla 13. Características clínicas.

Característica	Mamaglobina					CK19				
	Si		No		p	Si		No		p
	(n=50)		(n=251)			(n=37)		(n=264)		
	n	%	n	%		n	%	n	%	
Histología-WHO										
Ductal	40	80	166	66.1	0.58	31	83.8	175	66.3	0.22
Lobulillar	8	16	58	23.1		4	10.8	62	23.5	
Medular	0	0	8	3.2		0	0	8	3	
Mucinoso	1	2	9	3.6		0	0	10	3.8	
Adenoide quístico	0	0	1	0.4		0	0	1	0.4	
Mixtos	1	2	9	3.6		2	5.4	8	3	
Tamaño tumoral (cm)										
0.1 - 2	38	76	211	85.8	0.08	29	78.4	220	84.9	0.13
2.1 - 3	11	22	33	13.4		7	18.9	37	14.3	
3.1 - 5	1	2	0	0		1	2.7	0	0	
5.1 - 10	0	0	2	0.8		0	0	2	0.8	
TNM										
T1N0M0	15	30	206	82.1	<0.01	14	37.8	207	78.4	<0.01
T1N1M0	23	46	12	4.8		17	45.9	18	6.8	
T1N2M0	1	2	2	0.8		0	0	3	1.1	
T2N0M0	2	4	25	10		0	0	27	10.2	
T2N1M0	9	18	5	2		6	16.2	8	3	
T2N2M0	0	0	1	0.4		0	0	1	0.4	
Estadio										
I	16	32	201	80.1	<0.01	14	37.8	203	76.9	<0.01
IIA	25	50	36	14.3		17	45.9	44	16.7	
IIB	8	16	4	1.6		6	16.2	6	2.3	
IIIA	1	2	4	1.6		0	0	5	1.9	
0	0	0	6	2.4		0	0	6	2.3	

En la tabla 13, n: Frecuencia absoluta, %: Frecuencia relativa (%), *p*: Valor *p* del test exacto de Fisher

7.4 Características inmunohistoquímicos y patológicas

De los ganglios positivos para mamaglobina el 74% (37/50) expresaron receptores de estrógenos, el 72%(36/50) receptores de progesterona, el marcador Ki-67 $\leq$ 5% se presentó en el 50%(25/50), el 82% (41/50) fueron negativos para HER2, 56%(28/50) fueron positivas por H&E, 18% (9/50) positivas por IHQ, y 74%(37/50) lo fueron para H&E+IHQ. De los SNL positivas para CK19, el 70.3% (26/37) expresaron receptores de estrogenos, y el 73%(27/37) receptores de progesterona, donde el 51.4% (19/37) presentaron el marcador Ki-67 $\leq$ 14% , el 86.5% (32/37) fueron negativos para HER2, 54.1%(20/37) fueron positivas por H&E, 21.6% (8/37) positivas por IHQ, y 75.7%(28/37) lo fueron para H&E+IHQ. Se observó asociación estadísticamente significativa entre pacientes positivas para Mamaglobina y CK19; y los marcadores H&E, IHQ y H&E+IHQ (Tabla 14)

Tabla 14. Características inmunohistoquímicas y patológicas.

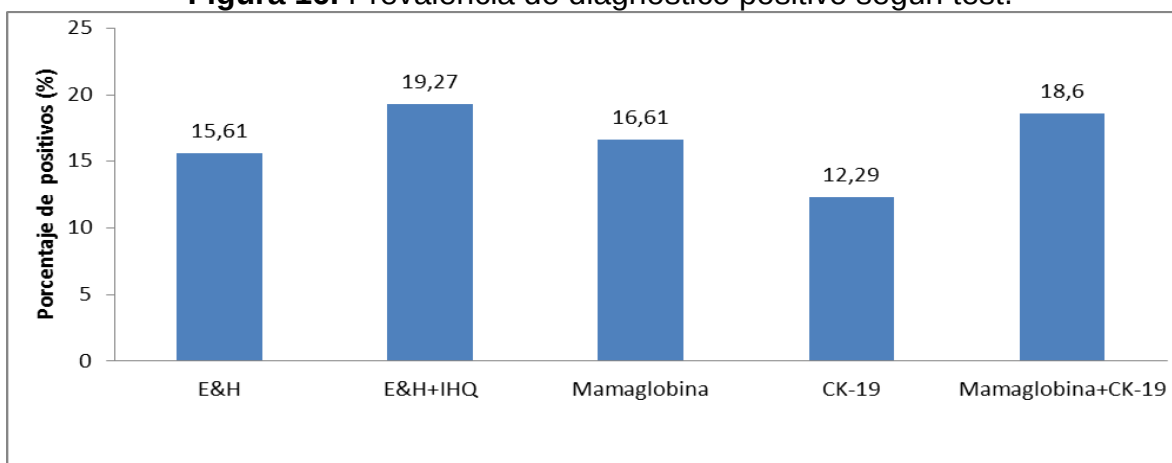
Característica	Mamaglobina				p	CK19				P
	Si		No			Si		No		
	(n=50)		(n=251)			(n=37)		(n=264)		
	n	%	N	%		n	%	n	%	
REstrógenos										
Positivo	37	74	209	83.3	0.19	26	70.3	220	83.3	0.11
Negativo	13	26	39	15.5		11	29.7	41	15.5	
Sin dato	0	0	3	1.2		0	0	3	1.1	
Progesteróna										
Positivo	36	72	189	75.3	0.76	27	73	198	75	0.79
Negativo	14	28	59	23.5		10	27	63	23.9	
Sin dato	0	0	3	1.2		0	0	3	1.1	
Ki 67										
≤14	25	50	100	39.8	0.08	19	51.4	106	40.2	0.16
15-50	14	28	114	45.4		10	27	118	44.7	
>51	11	22	34	13.5		8	21.6	37	14	
Sin dato	0	0	3	1.2		0	0	3	1.1	
HER2										
Positivo	9	18	28	11.2	0.33	5	13.5	32	12.1	0.86
Negativo	41	82	220	87.6		32	86.5	229	86.7	
Sin dato	0	0	3	1.2		0	0	3	1.1	
H&E										
Positiva	28	56	19	7.6	<0.01	20	54.1	27	10.2	<0.01
Negativa	22	44	232	92.4		17	45.9	237	89.8	
IHQ										
Positiva	9	18	2	0.8	<0.01	8	21.6	3	1.1	<0.01
Negativa	12	24	230	91.6		9	24.3	233	88.3	
No realizada	29	58	19	7.6		20	54.1	28	10.6	
H&E+IHQ										
Positiva	37	74	21	8.4	<0.01	28	75.7	30	11.4	<0.01
Negativa	13	26	230	91.6		9	24.3	234	88.6	

En la tabla 13, n: Frecuencia absoluta, %: Frecuencia relativa (%), p: Valor p del test exacto de Fisher.

7.5 Capacidad predictiva de Mamaglobina, Citoqueratina 19 y de CK19 más Mamaglobina

Se comparó la prevalencia de las pacientes diagnosticadas como positivas entre Mamaglobina por PCR y H&E ($p=0.89$), Mamaglobina por PCR y H&E+IHQ ($p=0.72$) en ningún caso se encontró diferencias significativas. Para CK19 por PCR tampoco se evidenció diferencias con H&E ($p=0.66$) y H&E+IHQ ($p=0.37$) respectivamente (ver Figura 16).

Figura 16. Prevalencia de diagnóstico positivo según test.



En la **tabla 15** se muestran las tablas de contingencia de los test H&E, IHQ y H&E+IHQ comparados con los test Mamaglobina RT-PCR, Citoqueratina 19 RT-PCR y qPCR.

Tabla 15. Relación entre H&E y IHQ y RT-PCR.

a. Relación H&E Vs Mamaglobina				b. Relación H&E Vs Citoqueratina			
	Mamaglobina (+)	Mamaglobina (-)	Total		CK19 (+)	CK19 (-)	Total
H&E (+)	28(9.30%)	19(6.31%)	47(15.61%)	H&E (+)	20(6.64%)	27(8.97%)	47(15.61%)
H&E (-)	22(7.31%)	232(77.08%)	254(84.39%)	H&E (-)	17(5.65%)	237(78.74%)	254(84.39%)
Total	50(16.61%)	251(83.39%)	301(100%)	Total	37(12.29%)	264(87.71%)	301(100%)

c. Relación H&E+IHQ Vs Mamaglobina				d. Relación H&E+IHQ Vs Citokeratina19			
	Mamaglobina (+)	Mamaglobina (-)	Total		CK19 (+)	CK19 (-)	Total
H&E+IHQ(+)	37(12.29%)	21(6.98%)	58(19.27%)	H&E+IHQ(+)	28(9.30%)	30(9.47%)	58(19.27%)
H&E+IHQ(-)	13(4.32%)	230(76.41%)	243(80.73%)	H&E+IHQ(-)	9(2.99%)	234(77.74%)	243(80.73%)
Total	50(16.61%)	251(83.39%)	301(100%)	Total	37(12.29%)	264(87.71%)	301(100%)

e. Relación H&E Vs Mamaglobina+CK-19				f. Relación H&E+IHQ Vs Mamaglobina+CK-19			
	RT-PCR (+)	RT-PCR (-)	Total		RT-PCR (+)	RT-PCR (-)	Total
H&E (+)	29(9.63%)	18(5.98%)	47(15.61%)	H&E+IHQ (+)	40(13.29%)	18(5.98%)	58(19.27%)
H&E (-)	27(8.97%)	227(75.42%)	254(84.39%)	H&E+IHQ (-)	16(5.32%)	227(75.42%)	243(80.73%)
Total	56(18.6%)	245(81.4%)	301(100%)	Total	56(18.6%)	245(81.4%)	301(100%)

La sensibilidad está dada por los falsos negativos, y representa la proporción de personas con el evento, correctamente identificadas, con respecto al total de personas. Los resultados en la muestra total muestran una sensibilidad moderada con la Mamaglobina (59.57%) y CK19 (42.55%), sin embargo la combinación de ambas aumento la sensibilidad en un promedio de 20% siendo para Mamaglobina+CK19 (61.7%) (**Ver tabla 16**). Teniendo como patrón de referencia la combinación H&E+IHQ se encontró una sensibilidad mayor en Mamaglobina (63.79%), CK19 (48.28%) y Mamaglobina+CK19 (68.97%) respectivamente (**ver tabla 17**).

Por otro lado, la especificidad está dada por los falsos positivos, indica el potencial de la prueba para detectar, correctamente, a las personas sin el evento. Los resultados de la muestra total teniendo como referencia H&E se obtuvo un (91.34%) de especificidad para Mamaglobina, de (93.31%) para CK19 y de (89.37%) para Mamaglobina+CK19 (**ver tabla 16**). En cambio cuando el patrón de referencia fue H&E+IHQ se encontraron valores de especificidad que para Mamaglobina por PCR el área fue 0.754, con un intervalo de confianza de (0.681-0.827) que no contiene al 0.5, indicando que un individuo seleccionado aleatoriamente del grupo de enfermos tiene un valor de la prueba mayor que uno

seleccionado aleatoriamente del grupo de sanos en el 75.4% de las veces (**ver tabla 16 y Figura 17a**), mientras que en CK19 se obtuvo un área de 0.679 y un intervalo de (0.606-0.752) (**ver tabla 16 y Figura 17b**); finalmente para Mamaglobina+CK-19 el área fue 0.755 con un intervalo de (0.682-0.828) (**ver tabla 16 y Figura 17c**).

Ahora bien, utilizando como patrón de referencia la combinación H&E+IHQ se obtuvo para Mamaglobina por PCR un área de 0.792 e intervalo (0.728-0.856) siendo significativamente diferente a 0.5 y más próximo a 1 (**ver tabla 17 y Figura 17d**); un comportamiento similar se encontró en CK19 por PCR con un área de 0.723 e intervalo (0.656 - 0.788) (**ver tabla 17 y Figura 17e**); por ultimo en RT-PCR se obtuvo un área de 0.812 y un intervalo de (0.749 - 0.973) (**ver tabla 17 y Figura 17f**).

El valor predictivo positivo es la probabilidad de que el resultado positivo de un test efectivamente signifique que el evento este presente, siendo para Mamaglobina (56%), CK19 (54.05%) y Mamaglobina+CK19 (51.79%) teniendo como patrón de referencia H&E (**ver tabla 16**); cuando el patrón de referencia fue H&E+IHQ el valor predictivo positivo aumento en promedio un 20% siendo en Mamaglobina (74%), CK-19 (75.68%) y Mamaglobina+CK19 (71.43%) (**Ver tabla 17**).

En conclusión tanto Mamaglobina, CK19 y Mamaglobina+CK19 mostraron valores de sensibilidad y especificidad similares aunque mayores cuando el patrón de referencia fue la combinación Mamaglobina+CK19. Por otra parte los resultados del análisis de curva ROC mostraron mediante la estimación del intervalo de confianza para el área que tanto Mamaglobina, CK19 y Mamaglobina+CK19, tuvieron la capacidad para distinguir entre el grupo de pacientes con y sin el evento evidenciando un aumento cuando el patrón de referencia que fue para la H&E+IHQ con respecto al patrón de referencia inicial H&E (**ver tabla 17**).

Tabla 16. Sensibilidad, especificidad y valores predictivos de Mamaglobina, CK19 y Mamaglobina+CK19 según H&E.

Indicador	Mamaglobina PCR	H&E CK19 PCR	Mamaglobina+CK19
Prueba diagnóstica			
Sensibilidad (%)	59.57	42.55	61.7
Especificidad (%)	91.34	93.31	89.37
Valor predictivo positivo (%)	56	54.05	51.79
Valor predictivo negativo (%)	92.43	89.77	92.65
Curva ROC			
Área	0.754	0.679	0.755
Error estándar	0.0372	0.0373	0.037
I.C. 95%	[0.681 - 0.827]	[0.606 - 0.752]	[0.682 - 0.828]

I.C 95%: Intervalo al 95% de confianza.

Tabla 17. Sensibilidad, especificidad y valores predictivos de CK19 y Mamaglobina+CK19 según H&E.

Indicador	Mamaglobina PCR	H&E+IHQ CK19 PCR	Mamaglobina+CK19
Prueba diagnóstica			
Sensibilidad (%)	63.79	48.28	68.97
Especificidad (%)	94.65	96.3	93.42
Valor predictivo positivo (%)	74	75.68	71.43
Valor predictivo negativo (%)	91.63	88.64	92.65
Curva ROC			
Área	0.792	0.723	0.812
Error estándar	0.032	0.034	0.032
I.C. 95%	[0.728 - 0.856]	[0.656 - 0.788]	[0.749 - 0.973]

I.C 95%: Intervalo al 95% de confianza.

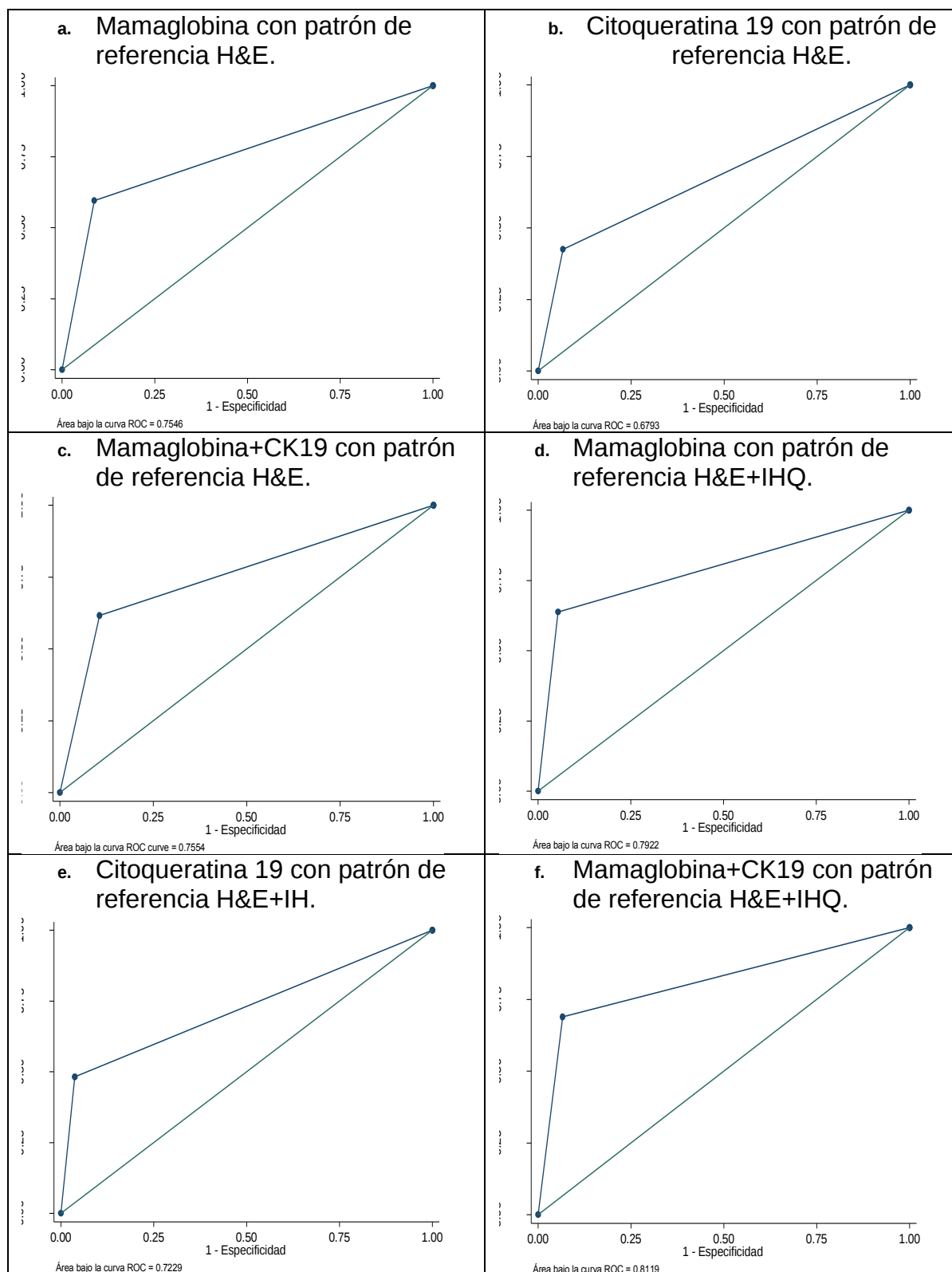


Figura 16. Curvas ROC según prueba diagnóstica de referencia. La estimación del intervalo de confianza para el área que tanto Mamaglobina por PCR, CK19 y

Mamaglobina+CK19 tuvieron la capacidad para distinguir entre el grupo de pacientes con y sin el evento evidenciando un aumento cuando el patrón de referencia que fue para la H&E+IHQ con respecto al patrón de referencia inicial H&E.

7.6 Resultados análisis de supervivencia

Los resultados del análisis de supervivencia mostraron que no hubo diferencia entre las curvas de supervivencia de acuerdo al resultado del test (positivo y negativo), sin embargo al cabo de 5 años las diferencias fueron notorias en H&E (73.9% Vs 89.9%), H&E+IHQ (74.3% Vs 89.9%) y Mamaglobina (78.2% Vs 89.9) . Se concluye que tanto el resultado del test como cada uno de los test no fueron factores pronósticos en términos de supervivencia (**ver tabla 19 y figura 17 y 18**).

Tabla 19. Supervivencia observada según prueba diagnóstica.

Test	1 año		2 años		3 años		4 años		5 años		6 años		p
	Sup (%)	I.C 95%	Sup (%)	I.C 95%	Sup (%)	I.C 95%	Sup (%)	I.C 95%	Sup (%)	I.C 95%	Sup (%)	I.C 95%	
H&E													
Positivo	100.0	-	100.0	-	97.1	[81.4-99.6]	88.7	[67.6-96.4]	73.9	[34.0-91.9]	-	-	0.751
Negativo	98.3	[95.6-99.4]	95.5	[91.8-97.6]	92.0	[87.5-95.0]	89.9	[84.7-93.5]	89.9	[84.7-93.5]	89.9	[84.7-93.5]	
H&E+IHQ													
Positivo	98.1	[87.1-99.7]	98.1	[87.1-99.7]	95.9	[84.5-98.9]	89.1	[72.12-96.0]	74.3	[34.7-91.9]	-	-	0.739
Negativo	98.7	[96.0-99.5]	95.7	[91.9-97.7]	92.1	[87.4-95.1]	89.8	[84.4-93.5]	89.9	[84.4-93.5]	89.9	[84.2-93.1]	
Mamaglobina													
Positivo	97.9	[86.1-99.7]	97.9	[86.1-99.7]	95.7	[84.0-98.9]	89.3	[72.8-96.1]	78.2	[45.4-92.6]	-	-	0.787
Negativo	98.7	[96.1-99.6]	95.8	[92.0-97.8]	92.1	[87.4-95.1]	89.9	[84.5-93.5]	89.9	[84.5-93.5]	89.9	[84.5-93.5]	
CK19													
Positivo	99.6	[81.9-99.6]	99.6	[81.9-99.6]	98.5	[79-98.5]	98.5	[79-98.5]	-	-	-	-	0.470
Negativo	99.6	[96.3-99.6]	97.9	[92.4-97.9]	95.4	[88.1-95.4]	92.9	[83.6-92.9]	92	[81.2-92]	92	[81.2-92]	
Mamaglobina+CK19													
Positivo	99.7	[87.6-99.7]	99.7	[87.6-99.7]	99	[85.7-99]	96.5	[75.5-96.5]	93.4	[49.9-93.4]	-	-	0.983
Negativo	99.6	[96-99.6]	97.7	[91.8-97.7]	94.9	[87-94.9]	93.3	[84.1-93.3]	93.3	[84.1-93.3]	93.3	[84.1-93.3]	

Sup (%): Supervivencia observada (%).

I.C 95%: Intervalo de confianza de la supervivencia observada.

p: Valor del test de log-Rank para ver diferencias en la supervivencia según resultado del test.

-: Supervivencia no estimada.

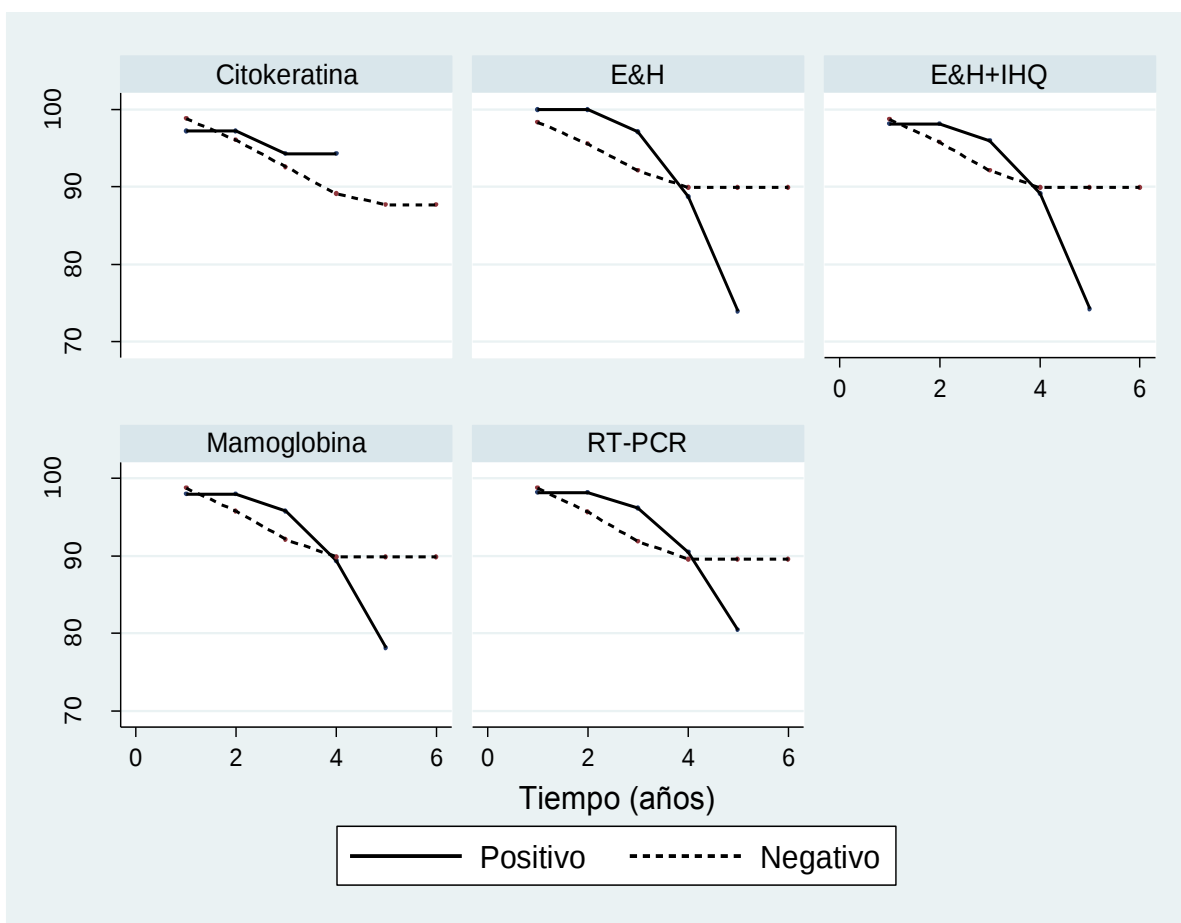


Figura 17. Supervivencia observada según prueba diagnóstica de referencia

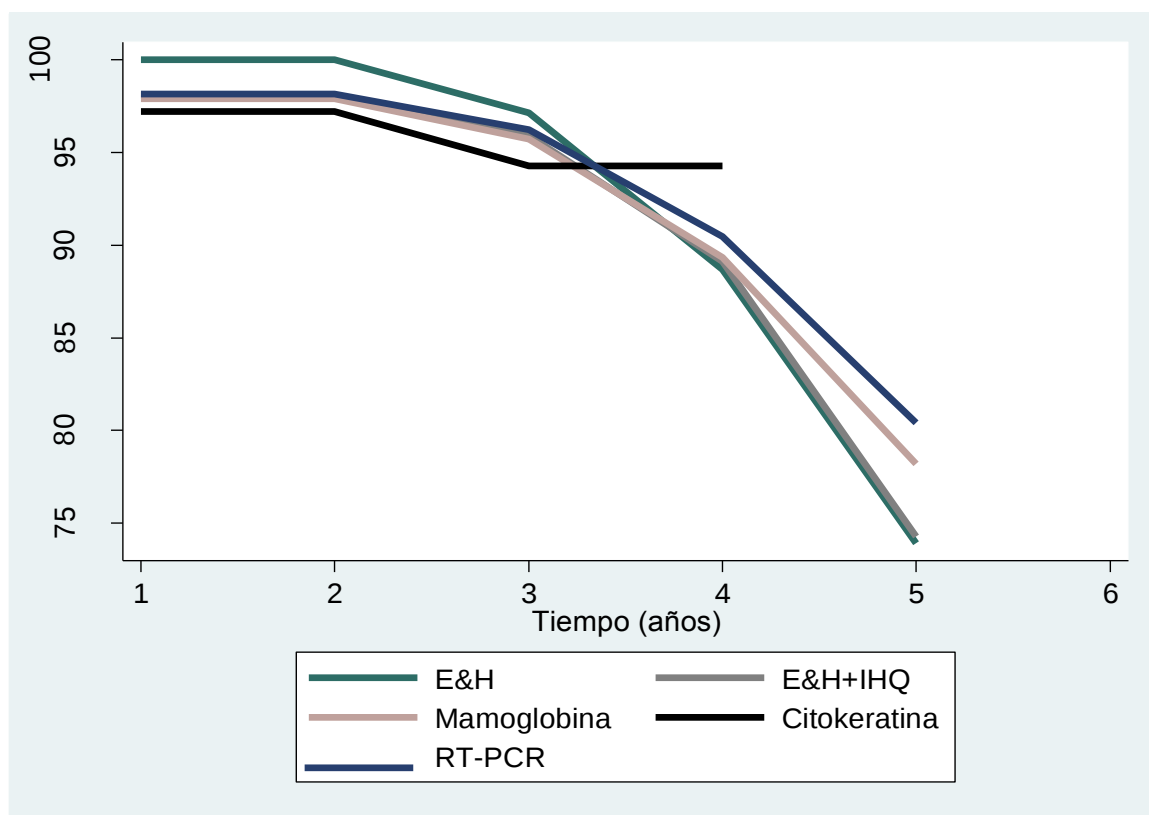


Figura 18. Supervivencia observada resultado positivo según prueba diagnóstica de referencia.

8. DISCUSIÓN

El cáncer de mama es una enfermedad sistémica que genera una gran problemática sanitaria, social y económica, puesto que es la neoplasia diagnosticada con más frecuencia en las mujeres occidentales. En la distribución etaria de dicha enfermedad en el estudio, se pueden observar dos subgrupos que presentan la máxima frecuencia. Los grupos descritos son entre 45 y 55 años y entre 65 y 75 años. Esta organización bimodal de la incidencia del cáncer de mama ya ha sido descrita por otros autores, como es el caso de Jatoi I. y col (98), en cuyo artículo se definen dos tipos de cáncer de mama en relación con la edad debido fundamentalmente a las diferentes características tumorales. En esta publicación se afirma que la máxima frecuencia de la neoplasia mamaria, se produce en dos picos; el primero de ellos a los 50 años, siendo tumores altamente agresivos y el segundo grupo, a los 70 años, con cáncer de bajo riesgo. Los estudios moleculares permiten proveer de mayor conocimiento, en cuanto a la diferenciación de las células tumorales, en estos dos subtipos de cáncer de mama.

Los antecedentes familiares de la paciente es un dato de gran importancia en el momento de realizar la anamnesis de la historia clínica, debido fundamentalmente, a que aquellas mujeres con casos de cáncer de mama en familiares de primer y segundo grado tiene un riesgo incrementado de padecer dicha enfermedad. En estudios realizados en centros con datos de tumores hereditarios se ha observado que el 73% de los mismos se regían por un patrón genético, mientras que el 26% se debía a factores ambientales (99). En la muestra del trabajo se describe que un 29.5% de las pacientes presentaban antecedentes familiares oncológicos, siendo más común el de origen mamario y posterior a otra estirpe, bien sea colon, ovario o melanoma. En cuanto a los antecedentes personales de las pacientes objeto de estudio, la mayoría de ellas no presentó ningún dato de interés, en contraposición con 3 casos de patología oncológica previa (100).

Es claro que el estado de los ganglios linfáticos es el indicador pronóstico más

importante en el cáncer de mama y afecta directamente al manejo clínico de las pacientes tradicionalmente por su estadiaje, lo que lleva a realizar una linfadenectomía axilar completa que produce una elevada morbilidad a mediano y largo plazo. Sin embargo, en tumores tempranos de hasta 3 cm, no existen metástasis linfáticas en el 68%-97% de las pacientes. La cirugía radioguiada del ganglio centinela permite analizar el primer ganglio linfático que recibe el drenaje tumoral y si es negativo, evita la linfadenectomía, teniendo en cuenta estas ventajas del procedimiento, nosotros quisimos desarrollar una metodología molecular que permita el diagnóstico preciso de las metástasis a este ganglio centinela y que pueda ser utilizada en el mismo acto quirúrgico, evitando re intervenciones.

En todos nuestros casos se realizó estudio intraoperatorio (congelación), además de impronta y estudio molecular, para que sean comparables los test y los resultados que presentamos en el documento y poder realizar las curvas ROC (101)(83).

Actualmente son aceptables hasta 3 ganglios centinela, aunque se recomienda limitar su número a 2, en nuestra serie se cumplió este criterio (102).

El objeto de tener un diagnóstico preoperatorio mas fidedigno y certero es con el fin de realizar cirugías menos agresivas y de este modo disminuir la morbilidad tan elevada que generan los tratamientos radicales de la mama. En esta serie de pacientes existe un predominio de la cirugía conservadora, lo que refleja una baja morbilidad. En todos los casos se realizo la técnica intraoperatoria del ganglio centinela, llevando a linfadenectomía axilar el 19.27% de las pacientes.

La biopsia selectiva del ganglio centinela es una técnica diagnostica multidisciplinaria, precisa la colaboración de diferentes especialidades medicas y quirúrgicas. Tradicionalmente ha sido precisa una validación de dicha técnica, la cual actualmente es aconsejable sustituirla por un proceso de aprendizaje

supervisado en el contexto de un grupo con experiencia según la Sociedad Española de Senología y Patología mamaria (103). Este aprendizaje debe ser realizado con grupos que hayan hecho más de 300 casos de biopsias selectivas de ganglio centinela en fase de aplicación clínica con parámetros de validación definidos en los consensos previos así: 95% de tasa de identificación del o de los ganglios centinela, tasa de falsos negativos del 5% o menos. El objetivo del aprendizaje tutelado debe alcanzar unos estándares en indicadores de calidad relacionados con el procedimiento.

Los ganglios linfáticos evaluados de nuestras pacientes se estudiaron en su totalidad con las técnicas convencionales, pero se fragmentó para el estudio molecular por RT-PCR, se determinó un diagnóstico intraoperatorio con impronta y la coloración de Hematoxilina y Eosina, con posterior estudio de inmunohistoquímica con la Citoqueratina AE1/AE3, uno de los fragmentos del ganglio linfático fue determinado para estudio molecular puesto que este estudio es de investigación y pretende demostrar que la técnica molecular es una buena opción diagnóstica y que permite observar una sensibilidad, especificidad, VPP y VPN, comparables con la H&E y la H&E-IHQ pero que las logra superar al no ser patólogo experto dependiente, logrando estudiar todo el ganglio en la práctica clínica y evitando re intervenciones. Cualquier método histológico tiene una serie de limitaciones y entre ellas es el sesgo por lo que se recomienda que la biopsia congelada sea valorada por varios patólogos para eliminar la subjetividad de los resultados, pero es de difícil implementación por el tiempo quirúrgico de espera y por el tamaño de los fragmentos del ganglio centinela extraído (104–106).

El estudio histológico intraoperatorio (congelación) consiste en secciones a distintos niveles que permiten detectar, metástasis de más de 2 mm, lo cual se realizó en nuestra serie de pacientes (107).

Esta evaluación no permite el estudio del ganglio centinela en su totalidad, por lo que debe completarse con el estudio diferido del ganglio centinela restante en el

laboratorio de patología. En estos casos, el diagnóstico definitivo, postoperatorio, debe incluir, al menos, secciones cada 200 micras del tejido restante(107).

El estudio histológico postoperatorio suele remitirse entre 3 y 5 días después de la intervención quirúrgica. La espera del diagnóstico definitivo puede causar ansiedad a la paciente. El diagnóstico definitivo, diferido, puede dar lugar a una segunda intervención cuando esté indicada una linfadenectomía axilar. La segunda intervención puede tener mayor dificultad técnica y mayor riesgo de complicaciones que la primera, al tratarse de un territorio ya manipulado por la cirugía previa (31)(90).

El primer método de estudio intraoperatorio del ganglio centinela fue mediante citología. Los resultados de esta técnica varían en función del grado de sección del ganglio linfático a estudiar y de la técnica empleada para la realización de la citología (H&E, Papanicolaou o Giemsa), sin olvidar que es una prueba operador dependiente. Por consiguiente la sensibilidad de la citología para la detección de metástasis a nivel del ganglio centinela se va a encontrar modificada en función de la tinción utilizada para su realización, por lo tanto en caso de empleo de Giemsa, la sensibilidad varia de 33% a 81.1%(108,109), con el Papanicolaou 62% al 91% (104,110,111), mientras que con la H&E se encuentra entre 41% y 96% (95). La sensibilidad de la citología con Giemsa puede ser inferior que si se utiliza la tinción de Papanicolaou o Hematoxilina y eosina, especialmente para la detección de micrometástasis.

En el año 2009, Fujishima M y cols (112) presentaron una comparación entre el estudio citológico intraoperatorio mediante tinción de Papanicolaou y su asociación con la técnica de inmunohistoquímica. Se observa una variación de los valores de sensibilidad importantes. Mientras que el porcentaje de sensibilidad con la preparación de Papanicolaou exclusivamente es del 30%, puede ascender hasta un 79% si se asocia a otro método. La especificidad es similar en ambos casos con cifras elevadas 99% si se tiñe solo con Papanicolaou y 98% si se añade la

inmunohistoquímica.

El intento de mejorar el diagnóstico de metástasis en el ganglio centinela de manera intraoperatoria lleva consigo el gran auge de estudios recientes sobre dicho tema. En Londres, Hamidian Jahromi A y cols, realizaron un estudio retrospectivo en 74 pacientes, con 146 ganglios linfáticos. Se realizó citología con H&E intraoperatoria en todos los casos, alcanzándose una sensibilidad del 60% y una especificidad del 99,2% en la detección de metástasis en el ganglio estudiado (105) . En otro trabajo publicado se comparó la citología intraoperatoria del ganglio centinela en dos unidades mamarias del Reino Unido, alcanzando un mayor tamaño muestra de 166 pacientes, se observa como la sensibilidad de dicha prueba es del 61.7%, mejorando la misma a medida que se realizan secciones para estudio más pequeñas y si se emplean métodos de inmunohistoquímica ultra rápida (113).

Para intentar establecer una resolución y alcanzar un adecuado diagnóstico de las micrometástasis en el ganglio centinela del cáncer de mama y de este modo mejorar la calidad de vida y la supervivencia libre de enfermedad se ha introducido la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR). El manejo molecular mediante qPCR intraoperatorio permite minimizar y estandarizar la evaluación histológica del ganglio centinela, evitando la dependencia inter e intraobservador del estudio citológico intraoperatorio. Tafe L. J y cols (114)(98) presentan un artículo basado en el estudio de la expresión del RNA empleando como marcadores génicos: Mamaglobina, Citoqueratina 19 y Porfobilinógeno Desaminasa. En dicho estudio se recoge un tamaño muestral de 59 pacientes, obteniendo una sensibilidad para la RT-PCR de 88.9% y una especificidad del 93.5%.

En el año 2008 se publicó un artículo de Julian T.B y col (106), presentando un modelo de test molecular para el estudio intraoperatorio de ganglios centinela de pacientes con cáncer de mama precoz. La validación de la técnica permitió

extrapolar el valor de sensibilidad de un 87.6% y de especificidad de un 94.2% para dicha técnica. En nuestro trabajo la capacidad de detectar un caso de ganglio centinela sin metástasis y que será realmente un ganglio linfático negativo es de un 92.65%.

En Bélgica, Martin Martínez I y col (115) publicaron un trabajo sobre la comparación de la técnica molecular RT-PCR con los estudios histopatológicos (H&E+IHQ) para establecer la comparación de la detección de metástasis en el ganglio centinela de forma intraoperatoria. La sensibilidad obtenida fue de un 92% con 97% de especificidad.

Recientemente la biopsia óptica consigue una amplificación genética segura y rápida (30 minutos) que la morfológica en la detección de metástasis en el ganglio centinela. Este método se denomina técnica OSNA (One Step Nucleic Acid Amplification), con amplificación isotérmica RT-LAMP (Reverse Transcriptase Loopmediated Isothermal Amplification). El método OSNA consiste en la amplificación de genes (Citoqueratina 19) a tiempo real del RNA mensajero (RNAm). Para determinar la sensibilidad y especificidad de OSNA basado en la expresión de RNAm de la CK19 se compara el estudio histológico, obteniendo como resultado valores de sensibilidad entre 87.5% y 98.1% y especificidad de 90.8% y 94.3%(116–118)

Por ello los métodos histológicos tienen un rango de sensibilidad que puede variar desde el 55% al 91% en las secciones congeladas y de 30 a 96% en los estudios citológicos, esto hace sospechar que se encuentran en una segunda posición en el diagnóstico intraoperatorio puesto que la sensibilidad de las técnicas de biología molecular son elevadas sin la gran variabilidad del rango acontecida en los procedimientos anatomopatológicos(115).

Nuestra investigación permite corroborar que la técnica molecular por reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR y qPCR) es segura, con sensibilidad,

especificidad, VPP y VPN comparables con la técnicas convencionales, teniendo en cuenta que no se estudio todo el ganglio linfático con la técnica molecular, nosotros obtuvimos una sensibilidad de 68.9%, especificidad del 93.42%, VPP del 71.43 % y VPN del 92.65 %. Nuestra sensibilidad del 68.9% pudo ser afectada por el subtipo histológico tumoral que no expresara CK19, por variables al obtener el fragmento aleatoriamente negativo para las células tumorales metastásicas dentro del tejido congelado o por variables en el diseño del cebador para la PCR.

En la actualidad la técnica molecular llamada *one step nucleic amplification* (OSNA de SysmexTM) es considerada el procedimiento de elección para el estudio patológico del ganglio centinela y que según nuestra tesis apoyaría su recomendación en nuestro medio, resultando en una mayor eficiencia al sistema de salud. Aunque la mayor barrera para los anatomopatólogos convencionales es el no tener material para posterior estudio, lo cual no sería necesario según la evidencia presentada (119–121)

La técnica molecular realizada por nosotros fue dividida en dos procedimientos uno cualitativo y otro cuantitativo basado en el análisis por amplificación de ARNm de la CK19 y Mamaglobina, con puntos de corte bien definidos para evitar los resultados falsos positivos y falsos negativos y que permitieron distinguir el tamaño de las metástasis en los casos donde utilizamos qPCR con la combinación de los dos genes CK19 y Mamaglobina. (112)

La técnica molecular OSNA es un procedimiento cualitativo y cuantitativo altamente específico, basado en el análisis por amplificación de ARNm de la CK19, con puntos de corte bien definidos y que también permite distinguir el tamaño de las metástasis, lo cual es comparable con los resultados de esta investigación.

Es de anotar que si comparamos la sensibilidad y especificidad de la CK19 sola frente a la Mamaglobina, la Mamaglobina en nuestro estudio supera a la CK19 en

el diagnóstico positivo según el test así: CK19 12.29 % vs Mamaglobina 16.61% y combinados los dos genes tenemos 18.6%, superando a la Hematoxilina y eosina sola 15.61% y siendo comparable con la H&E+IHQ con un 19.27%. (119,120,122)

En los estudios moleculares se ha visto que el nivel de expresión del ARNm de la CK19 se correlaciona con el volumen de la metástasis, eso lo podemos evidenciar en nuestro trabajo igualmente con la CK19 y Mamaglobina (122).

El tiempo necesario para el diagnóstico con el RD-100i/OSNA TM oscila alrededor de 30 min en función del número de ganglios estudiados, en nuestro estudio el tiempo oscila con qPCR (GeneSearch TM Breast Lymph Node Veridex) entre 20 y 30 minutos, considerando que estudiamos dos genes a diferencia de OSNA que estudia solo la CK19 (123).

Todos nuestros casos tuvieron impronta antes de ser fraccionados para el estudio molecular, lo cual es recomendado especialmente para evitar las contaminaciones y correlacionar con el resultado final, evitando así falsos negativos cuando se utiliza una técnica molecular, esto permite evidenciar que la observación microscópica y correlación citológica es la base de la patología molecular. (123,124)

Algunos recomiendan la técnica molecular como primera opción de estudio patológico y si no se cuenta con ella es aceptable el estudio por congelación del ganglio linfático, esto se aplica cada vez más en centros especializados para cáncer de mama en España y podría en el futuro estar en un centro como la Fundación Valle del Lili en Colombia.

Fujishima y colaboradores (112)(96) concluyen que la biopsia intraoperatoria debe realizarse por patólogos experimentados, como expresan las publicaciones y siempre que sea posible dentro del hospital realizando la asociación entre H&E e

IHQ. En este estudio se habla de los falsos positivos por IHQ donde se recomienda ser interpretada con precaución evitando diagnósticos erróneos.

Teniendo en cuenta que del 60 al 70% de las pacientes en estadios tempranos no tienen afectación ganglionar, nosotros en nuestra serie encontramos un 80.73 % de las paciente negativas al estudiar los ganglios centinela, esto efectivamente impacta en la sobrevida y recidiva de este grupo de pacientes (125).

La Unidad de Mama de cada hospital debe proveer la calidad del ARNm del tejido ganglionar y optimizar el tiempo de respuesta por el laboratorio de patología molecular cuando se instaura este tipo de metodologías diagnosticas.

Tabla 20. Se compara las sensibilidad, especificidad de diferentes técnicas de realización de la biopsia intraoperatoria del ganglio centinela.

Autor	año	Casos	Método	Sensibilidad	Especificidad
Nagashima y cols (93)	2003	124	Papanicolaou	62%	99%
Barranger y cols (91)	2004	185	Giemsa	33%	98%
Jahromi y cols (87)	2009	74	H&E	60%	99.2%
Fujishima y cols (96)	2009	92	IHQ	79%	98%
Tafe y cols (98)	2010	59	RT-PCR	88.9%	93.5%
Backus y Cols(85)	2005	318	Microarray RT-PCR (MGB, CK19)	90%	94%
Wallwiener y Cols (86)	2011	315	qRT-PCR (CK19, MGB1, EPCAM, NY-BR-1)	88.1%	95.2%
Tamaki y cols (102)	2009	164	OSNA	87.5%	94.3%
ESTUDIO HCSC	2014	301	RT-PCR	68.9%	93.42%

9. CONCLUSIONES

- La biopsia selectiva del ganglio centinela es el procedimiento de elección para la estadificación axilar del cáncer de mama y permite seleccionar un subgrupo de pacientes en las que la linfadenectomía axilar no aporta ningún beneficio adicional.
- Se recomienda estudiar el ganglio centinela en su totalidad a fin de evitar sesgos de localización por lo que la técnica molecular, permite el estudio del ganglio centinela en su totalidad.
- Nuestra metodología ha sido diseñada para determinar dos genes CK19 y Mamaglobina, ambos genes sensibles y específicos para determinar las metástasis ganglionares de forma cuantitativa logrando discriminar micrometástasis, macrometástasis y células tumorales aisladas.
- Los beneficios de estudiar el ganglio centinela por RT-PCR permitiría evitar segundas intervenciones puesto que el estudio completo se realizaría durante el mismo tiempo quirúrgico.
- El estudio por metodologías moleculares permitiría menos re intervenciones y menos posibilidades de falsos positivos o negativos.
- En conclusión tanto la Mamaglobina, la CK19 y CK19+Mamaglobina mostraron valores de sensibilidad y especificidad similares aunque mayores cuando el patrón de referencia fue la combinación de los genes por RT-PCR.
- Por otra parte los resultados del análisis de curva ROC mostraron mediante la estimación del intervalo de confianza para el área que tanto

Mamaglobina, CK19 y CK19+Mamaglobina tuvieron la capacidad para distinguir entre el grupo de pacientes con y sin el evento evidenciando un aumento cuando el patrón de referencia para la H&E+IHQ con respecto al patrón de referencia inicial H&E

- La determinación de la positividad según la técnica fue así: CK19 12.29 % vs Mamaglobina 16.61% y combinados los dos genes 18.6%, superando a la Hematoxilina y eosina sola 15.61% y siendo comparable con la H&E+IHQ con un 19.27%.
- La supervivencia al cabo de 5 años en los casos positivos vs negativos fueron notorias en H&E (73.9% Vs 89.9%), H&E+IHQ (74.3% Vs 89.9%) y Mamaglobina (78.2% Vs 89.9%).
- El resultado positivo de la prueba RT-PCR por PCR o qPCR conlleva un aumento en la probabilidad de recidiva tumoral. Esta predicción no se consigue con otros factores pronóstico en la misma población.
- El diagnóstico de tumores en estadios tempranos es el objetivo de un programa de screening el cual impacta en la sobrevivencia de las mujeres afectadas con cáncer de mama.
- Esperamos que un trabajo de este tipo permita hacer accesible y confiable esta metodología molecular para los centros especializados de mama en Colombia.

9. PERSPECTIVAS

La técnica objeto de esta tesis doctoral es la Reacción en Cadena de la Polimerasa de forma cualitativa y cuantitativa en Tiempo Real (PCR y qPCR) por retro transcripción (RT-PCR) como un marcador ideal para el estudio intraoperatorio de la biopsia del ganglio centinela, la cual nos da un resultado objetivo, rápido y reproducible estudiando dos genes CK19 y Mamaglobina.

Cuando usamos la qPCR demostramos que es un valor cuantitativo y no depende del observador. Esta información establece la diferencia de gran relevancia con respecto a los resultados de anatomía patológica.

Debido a la baja sensibilidad y a la necesidad de personal con experiencia y habilidad para un correcto diagnóstico intraoperatorio por anatomía patológica muchos centros precisan de un gran número de re intervenciones, con alta morbilidad para las pacientes.

Los resultados obtenidos en esta tesis permiten recomendar el uso de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) cuantitativa en tiempo real (qPCR) como solución diagnostica intraoperatoria para el ganglio centinela en cáncer de mama, siendo una metodología que puede ser adoptada en nuestros hospitales y que estandarizada es una solución diagnostica rápida, objetiva y con una elevada precisión.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. IARC. Estimated Cancer Incidence, mortality All cancer. non-melanoma skin cancer. world. 2015.
2. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JWW, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*. 2013 Apr;49(6):1374–403.
3. IARC. Breast Estimated incidence , all ages- Europe. *Globocan 2012*. 2015. p. 7–8.
4. Kelley MC, Hansen N, McMasters KM. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. *Am J Surg*. 2004 Jul;188(1):49–61.
5. Kuijt GP, Voogd a C, van de Poll-Franse L V, Scheijmans LJEE, van Beek MWPM, Roumen RMH. The prognostic significance of axillary lymph-node micrometastases in breast cancer patients. *Eur J Surg Oncol*. 2005 Jun;31(5):500–5.
6. Rivers A, Hansen N. Axillary management after sentinel lymph node biopsy in breast cancer patients. *Surg Clin North Am*. 2007 Apr;87(2):365–77, ix.
7. Gusterson B. The new TNM classification and micrometastases. *The Breast*. 2003 Dec;12(6):387–90.
8. Itas MM, Ikhitarian KM, Alters CW, Aron PLB, Lliott BME, Rothers TEB, et al. QUANTITATIVE REAL-TIME RT-PCR DETECTION OF BREAST CANCER MICROMETASTASIS USING A MULTIGENE MARKER PANEL. *Int J Cancer*. 2001;171(January):162–71.
9. Mehta S, Shelling A, Muthukaruppan A, Lasham A, Blenkiron C, Laking G, et al. Predictive and prognostic molecular markers for cancer medicine. *Ther Adv Med Oncol [Internet]*. 2010 Mar [cited 2016 Mar 23];2(2):125–48. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3126011&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
10. García-Peláez B, Verdú M, Román R, Rodón N, Pubill C, Díaz O, et al. Expresión inmunohistoquímica de CK19 en variantes comunes del carcinoma de mama y en subtipos histológicos infrecuentes. *Rev Española*

Patol [Internet]. 2015 Apr;48(2):67–74. Available from:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1699885515000112>

11. Banys M, Müller V, Melcher C, Aktas B, Kasimir-Bauer S, Hagenbeck C, et al. Circulating tumor cells in breast cancer. Clin Chim Acta [Internet]. Elsevier B.V.; 2013 Aug 23 [cited 2016 Feb 9];423:39–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23623805>
12. Uawisetwathana U, Rodpai E, Moongkarndi P. Gene expression of cytokeratin 19 and its molecular detection in human breast cancer cell lines. J Pharm Biomed Anal [Internet]. Elsevier B.V.; 2016 Feb 20 [cited 2016 Feb 9];120:25–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26690255>
13. Tryfonidis K, Kafousi M, Perraki M, Apostolaki S, Agelaki S, Georgoulas V, et al. Detection of circulating cytokeratin-19 mRNA-positive cells in the blood and the mitotic index of the primary tumor have independent prognostic value in early breast cancer. Clin Breast Cancer [Internet]. Elsevier Ltd; 2014 Dec [cited 2016 Feb 9];14(6):442–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24958324>
14. Stathopoulou A, Angelopoulou K, Perraki M, Georgoulas V, Malamos N. Quantitative RT-PCR luminometric hybridization assay with an RNA internal standard for cytokeratin-19 mRNA in peripheral blood of patients with breast cancer. 2002;34(2001):651–9.
15. Oezkan F, Khan AM, Hager T, Freitag L, Christoph D, Darwiche K. OSNA: A Fast Molecular Test Based on CK19 mRNA Concentration for Assessment of EBUS-TBNA Samples in Lung Cancer Patients. Clin Lung Cancer [Internet]. Elsevier Inc.; 2015 Sep 21 [cited 2016 Feb 25];1–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26455862>
16. Zhang L, Lohse CM, Dao LN, Smyrk TC. Proposed histopathologic grading system derived from a study of KIT and CK19 expression in pancreatic endocrine neoplasm. Hum Pathol [Internet]. Elsevier Inc.; 2011 Mar [cited 2016 Feb 25];42(3):324–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21190722>
17. Breasted JH. The Edwin Smith Surgical Papyrus. Calssic of med lib. III. Chicago: University de Chicago; 1930.
18. Grooss SD. System of Surgery. 5th ed. Philadelphia.: Henry C. Lea's son & Company; 1872.

19. Grooss SW. An analysis of two hundred and seven cases of carcinoma of the breast. *Med News*. 1887;(51):613–6.
20. Halsted WS. The Results of Operations for the Cure of Cancer of the Breast Performed at the Johns Hopkins Hospital from June, 1889, to January, 1894. *Ann Surg*. 1894;20(5):497–555.
21. Fisher B, Redmond C, Fisher E. The contribution of recent NSABP clinical trials of primary breast cancer therapy to an understanding of tumor biology--an overview of findings. *Cancer*. 1980;4 Suppl(46):1009–25.
22. Ehrlich P. Closing Notes on Experimental chemotherapy of spirillosco. Berlin: J Springer; 1910.
23. HEIDELBERGER C, CHAUDHUR IN, DANNEBERG P, MOOREN D, GRIESBACH L, DUSCHINSKY R, et al. Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. *Nature*. 1975;179:663–6.
24. Moulin D De. A Short History of Breast Cancer. *oxfordjournals*. 1983;102.
25. McGuire W, DeLaGarza M. Similarity of the estrogen receptor in human and rat mammary carcin. *J Clin Endocrinol Metab*. 1973;36(3):548–52.
26. Barba J G. Local management of invasive breast cancer: axillary diseases of the breast. 2004.
27. Krag D, Weaver D, Ashikaga T, Moffat F, Klimberg V, Shriver C, et al. The sentinel node in breast cancer--a multicenter validation study. *N Engl J Med*. 1998;941–6.
28. Veronesi U, Paganelli G, Galimberti V, Viale G, Zurrida S, Bedoni M, et al. Sentinel-node biopsy to avoid axillary dissection in breast cancer with clinically negative lymph-nodes. *Lancet*. 1997;349:1–4.
29. Giuliano AE. Sentinel Node Biopsy: Standard of Care. *Breast J*. 2003;9(s1):s3–s6.
30. Von Smitten K. Surgical management of breast cancer in the future. *Acta Oncol*. 2000;39(3):437–9.
31. Bernet L, Piñero A, Vidal-Sicart S, Peg V, Giménez J, Algara M, et al. Consenso sobre la biopsia selectiva del ganglio centinela en el cáncer de mama. Revisión 2013 de la Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria. *Rev Senol y Patol Mamar*. 2014 Jan;27(1):43–53.

32. Bijker N, Meijnen P, Peterse J, Bogaerts J, Van Hoorebeeck I, Julien J, et al. Breast-Conserving Treatment With or Without Radiotherapy in Ductal Carcinoma-In-Situ: Ten-Year Results of European Organisation for Research and Treatment of Cancer Randomized Phase III Trial 10853--A Study by the EORTC Breast Cancer Cooperative Group and. *J Clin Oncol*. 2006 Jul;24(21):3381–7.
33. Fisher B, Redmond C, Poisson R, Richard M, Norman W, Wickerham L, et al. Eight-Year Results of a Randomized Clinical Trial Comparing Total Mastectomy and Lumpectomy with or without Irradiation in the Treatment of Breast Cancer — NEJM. *N Engl J Med*. 1989;320(13):822–8.
34. Viani G a, Stefano EJ, Afonso SL, De Fendi LI, Soares F V, Leon PG, et al. Breast-conserving surgery with or without radiotherapy in women with ductal carcinoma in situ: a meta-analysis of randomized trials. *Radiat Oncol*. 2007 Jan;2:28.
35. Sabel MS, Schott AF, Kleer CG, Merajver S, Cimmino VM, Diehl KM, et al. Sentinel node biopsy prior to neoadjuvant chemotherapy. *Am J Surg*. 2003 Aug;186(2):102–5.
36. Van Deurzen CHM, Vriens BEPJ, Tjan-Heijnen VCG, van der Wall E, Albrechts M, van Hilligersberg R, et al. Accuracy of sentinel node biopsy after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients: A systematic review. *Eur J Cancer*. 2009 Dec;45(18):3124–30.
37. Fisher B, Redmond C, Poisson R, Richard M, Norman W, Wickerham L, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;533(May):747–52.
38. Rafferty EA. Digital Mammography: Novel Applications. *Radiol Clin North Am*. 2007 Sep;45(5):831–43.
39. Pisano ED, Gatsonis C, Ph D, Hendrick E, Yaffe M, Baum JK, et al. Diagnostic Performance of Digital versus Film Mammography for Breast-Cancer Screening. *N Engl J Med*. 2005;353(17):1773–83.
40. Giuseppetti GM, Baldassarre S, Marconi E. Color Doppler sonography. *Eur J Radiol*. 1998 May;27, Supple(0):S254–S258.
41. Kook S, Park H, Lee Y, Lee Y, Pae W, Park Y. Evaluation of solid breast lesions with power Doppler sonography. *J Clin Ultrasound*. 1999;5:231–7.

42. Cho N, Moon WK, Cha J, Kim SM, Kim E, Kim MH, et al. Differentiating Benign from Malignant Solid Breast Masses : Comparison of Two-dimensional and Purpose : Methods : Results : Conclusion : Radiol Soc North Am. 2006;240(1):26–32.
43. Morris EA. Diagnostic Breast MR Imaging: Current Status and Future Directions. Magn Reson Imaging Clin N Am. 2010 Feb;18(1):57–74.
44. Van Goethem M, Tjalma W, Schelfout K, Verslegers I, Biltjes I, Parizel P. Magnetic resonance imaging in breast cancer. Eur J Surg Oncol. 2006 Nov;32(9):901–10.
45. Grahek A, Barranger B, Daraï E, Uzan U, Talbot J-N. Contribución de la tomografía por emisión de positrones con fluorodesoxiglucosa (18F) en las pacientes afectadas de cáncer genital o mamario - EM consulte. GINECOLOGÍA-OBSTETRICIA. 2006;689–A–25.
46. Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. Eur J Cancer. 2010 Mar;46(4):765–81.
47. INE. Defunciones según la Causa de Muerte Año 2009. España; 2011 p. np664.
48. american cancer society. What are the risk factors for breast cancer [Internet]. 2014 [cited 2016 Mar 15]. Available from: <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-risk-factors>
49. Colditz GA. Epidemiology of Breast Cancer Findings from the Nurses ' Health Study. Epidemiol Breast Cancer. 1982;71:1480–9.
50. Dupont W, Page D, Rogers L, Parl F. Influence of exogenous estrogens, proliferative breast disease, and other variables on breast cancer risk. Cancer. 1998;63(5):948–57.
51. Kvåle G, Heuch I. Menstrual factors and breast cancer risk. Cancer. 1988;62(8):1625–31.
52. Trichopoulos, Dimitrios MacMahon B, Cole P. Menopause and Breast Cancer Risk. J Natl Cancer Inst. 1972;48(3):605–13.
53. Brinton L, Schairer C, Hoover R, Fraumeni J. Menstrual factors and risk of breast cancer. Cancer invest. 1988;6(3):245–54.

54. Rosero-Bixby L, Oberle M, Lee N. Reproductive history and breast cancer in a population of high fertility, Costa Rica, 1984-85. *Int J Cancer*. 1987;40(6):747-54.
55. Stoll BA. Breast cancer : the obesity connection. *Br J Cancer*. 1994;801(I 994):1991-3.
56. Pike MC, Rosario BEHJTC, Gray GE. ORAL CONTRACEPTIVE USE AND EARLY ABORTION AS RISK FACTORS FOR BREAST CANCER IN YOUNG WOMEN RR for oral contraceptive (OC) use was. *J Cancer*. 1981;43(1):72-6.
57. Risch H, Howe G. Menopausal hormone usage and breast cancer in Saskatchewan a recor. *Am J Epidemiol*. 1994;139(7):670-83.
58. Sieri S, Krogh V, Ferrari P, Berrino F, Pala V, Thiébaud ACM, et al. Dietary fat and breast cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition 1 – 3. 2008;(1):1304-12.
59. Friedenreich CM, Woolcott CG, McTiernan A, Ballard-Barbash R, Brant RF, Stanczyk FZ, et al. Alberta physical activity and breast cancer prevention trial: sex hormone changes in a year-long exercise intervention among postmenopausal women. *J Clin Oncol* [Internet]. 2010 Mar 20 [cited 2016 Mar 31];28(9):1458-66. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2849767&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
60. Reynolds P, Hurley S, Goldberg DE, Anton-Culver H, Bernstein L, Deapen D, et al. Active Smoking, Household Passive Smoking, and Breast Cancer: Evidence From the California Teachers Study. *JNCI J Natl Cancer Inst* [Internet]. 2004 Jan 6 [cited 2016 Mar 31];96(1):29-37. Available from: <http://jnci.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/jnci/djh002>
61. Peled R, Carmil D, Siboni-Samocha O, Shoham-Vardi I. Breast cancer, psychological distress and life events among young women. *BMC Cancer* [Internet]. 2008 Jan [cited 2016 Mar 31];8:245. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2527614&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
62. Veronesi U, Banfi A, Salvadori B, Luini A, Saccozzi R, Zucali R, et al. Breast conservation is the treatment of choice in small breast cancer: long-term results of a randomized trial. *Eur J Cancer*. 1990;26(6):668-70.

63. Veronesi U, Marubini E, Mariani L, Valagussa P, Zucali R. The dissection of internal mammary nodes does not improve the survival of breast cancer patients. 30-year results of a randomised trial. *Eur J Cancer*. 1999 Sep;35(9):1320–5.
64. Bland KI, Copeland E. La mama manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas - I. Panamericana, editor. 2009.
65. Haigh PI, Giuliano AE. Intraoperative lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. *Oper Tech Gen Surg*. 2000;2(3):161–5.
66. Giuliano AE, Jones RC, Brennan M, Statman R. Sentinel lymphadenectomy in breast cancer. *J Clin Oncol*. 1997;15:2345–50.
67. Taft L. The learning curve and sentinel node biopsy. *AmJSurg*. 2001;182:347–50.
68. Morton DL, Wen DR, Wong JH, Economou JS, Cagle L a, Storm FK, et al. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg*. 1992;127:392–9.
69. Kelley M, Hansen N, McMasters K. Lymphatic mapping and sentinel lymph node biopsy for breast cancer. *Am J Surg*. 2004;188(1):49–61.
70. Krag D, Weaver D, Alex J, Fairbank J. Surgical resection and radiolocalization of the sentinel lymph node in breast cancer using a gamma probe. *Surgical Oncology*. 1993. p. 335–40.
71. Motomura K, Inaji H, Komoike Y, Hasegawa Y, Kasugai T, Noguchi S, et al. Combination technique is superior to dye alone in identification of the sentinel node in breast cancer patients. *J Surg Oncol*. 2001;76(2):95–9.
72. Bonadonna G, Valagussa P, Zucali R, Salvadori B. Primary chemotherapy in surgically resectable breast cancer. *CA Cancer J Clin*. 1995;45(4):227–43.
73. Bonadonna G. Current and future trends in the multidisciplinary approach for high-risk breast cancer. The experience of the Milan Cancer Institute. *Eur J Cancer*. 1996;32A(2):209–14.
74. Noguchi M, Tsugawa K, Bando E, Kawahara F, Miwa K, Yokoyama K, et al. Sentinel lymphadenectomy in breast cancer: Identification of sentinel lymph node and detection of metastases. *Breast Cancer Res Treat*. 1999;53:97–104.

75. Moreno a., Roman JM, Ruiz J, Cabrera M, González A, Carreras JL, et al. Biopsia del ganglio centinela en el carcinoma de mama: validación de la técnica radioisotópica. *Progresos Obstet y Ginecol*. 2005;48:436–43.
76. Villasante a, Martí C, Martín M, Armijo O, Usandizaga R, Pastrana FG. El ganglio centinela. *Actual Obs Giecológica*. 2001;XIII:9–14.
77. Blanco Sáiz I, Moriyón Entrialgo C, Gómez Barquín R, Díez Esteban M, Platero García D, Pelletán Fernández J, et al. Localización del ganglio centinela en cáncer de mama. Inyección periareolar del radiocoloide. *Rev Española Med Nucl*. 2004;23:95–101.
78. Smillie T, Hayashi A, Rusnak C, Dunlop W, Donald J, Van Der Westhuizen N. Evaluation of feasibility and accuracy of sentinel node biopsy in early breast cancer. *Am J Surg*. 2001;181(5):427–30.
79. Krontiras H, Bland KI. When is sentinel node biopsy for breast cancer contraindicated ? *Plast Reconstr Surg*. 2003;12:207–10.
80. Derossis AM, Fey J V, Cody HS 3rd, Borgen PI. Obesity influences outcome of sentinel lymph node biopsy in early-stage breast cancer. *J Am Coll Surg*. 2003;197(6):896–901.
81. Keyser CPTEA, Staat MBC, Fausett COLMB, Col L, Shields AD. Pregnancy-Associated Breast Cancer. *Rev Obs Gynecol*. 2012;5(2):94–9.
82. Leong a S. The prognostic dilemma of nodal micrometastases in breast carcinoma. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2000;27 Suppl 2:315–20.
83. Leidenius MH, Vironen JH, Riihela MS, Krogerus L a, Toivonen TS, von Smitten K a, et al. The prevalence of non-sentinel node metastases in breast cancer patients with sentinel node micrometastases. *EurJ SurgOncol*. 2005;31(1):13–8.
84. Alix-Panabières C, Vendrell J-P, Slijper M, Pellé O, Barbotte E, Mercier G, et al. Full-length cytokeratin-19 is released by human tumor cells: a potential role in metastatic progression of breast cancer. *Breast Cancer Res [Internet]*. 2009 Jan [cited 2016 Apr 1];11(3):R39. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2716508&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
85. Backus J, Laughlin T, Wang Y, Belly R, White R, Baden J, et al. Identification and Characterization of Optimal Gene Expression Markers for Detection of Breast Cancer Metastasis. 2005;7(3):327–36.

86. Wallwiener CW, Wallwiener M, Kurth RR, Röhm C, Neubauer H, Banyas MJ, et al. Molecular detection of breast cancer metastasis in sentinel lymph nodes by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR): identifying, evaluating and establishing multi-marker panels. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 2011 Dec [cited 2016 Apr 11];130(3):833–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21858660>
87. Wang Z, Spaulding B, Sienko A, Liang Y, Li H, Nielsen G, et al. Mammaglobin , a Valuable Diagnostic Marker for Metastatic Breast Carcinoma. 2009;384–9.
88. Shakir F, Joudi A. Human mammaglobin in breast cancer : a brief review of its clinical utility Discovery and nomenclature of human mammaglobin Chemistry and regulation of hMAG Function of mammaglobin protein Mammaglobin in breast cancer.
89. GIBBONS J. *Nonparametric Statistics Inference*. 4th ed. Mexico: McGraw-Hill; 1971.
90. HOLLANDER M, WOLFE D. *Nonparametric Statistical Methods*. 3rd ed. Mexico: Jhon Wiley & Sons; 1999.
91. SPRENT D, SMEETON F. *Applied Nonparametric Statistical Methods*. NewYork: Chapman & Hall CRC; 2000.
92. Altman DG, Bland JM. *Statistics Notes : Diagnostic tests 1 : sensitivity and specificity*. *Br Med J*. 1994;308:1552.
93. Altman DG, Bland JM. *Statistics Notes: Diagnostic tests 2: predictive values*. *Bmj*. 1994;309:102–102.
94. Aalen OO. Understanding the Shape of the Hazard Rate : A Process Point of View. *Stat Sci*. 2001;16:1–22.
95. Hougaard P. Fundamentals of survival data. *Biometrics*. 1999;55(1):13–22.
96. Cox D. *Journal of the Royal Statistical Society*. *J R Stat*. 2014;34(2):87–220.
97. Hamilton LC. *Statistics with Stata (Updated for Version 10)*. 2006.
98. Jatoi I, Anderson WF, Rosenberg PS. Qualitative age-interactions in breast cancer: a tale of two diseases? *Am J Clin Oncol*. 2008;31(5):504–6.

99. Couto E, Hemminki K. Estimates of heritable and environmental components of familial breast cancer using family history information. *Br J Cancer*. 2007;96:1740–2.
100. Bajo Arenas JM, Lailla Vicens J., Xercavins Montosa J. Fundamentos de ginecología. España: Médica Panamericana; 2009.
101. Layfield DM, Agrawal A, Roche H, Cutress RI. Intraoperative assessment of sentinel lymph nodes in breast cancer. *Br J Surg*. 2011;98(1):4–17.
102. Abou-Nukta F, Ariyan S. Sentinel lymph node biopsies in melanoma: how many nodes do we really need? *Ann Plast Surg*. 2008;60:416–9.
103. Piñero A, Giménez J, Merck B, Vázquez C. Reunión de consenso sobre la biopsia selectiva del ganglio centinela en el cáncer de mama. Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria. *Rev ESPAÑOLA*. 2007;40(2):91–5.
104. Motomura K, Nagumo S, Komoike Y, Koyama H, Inaji H. Accuracy of imprint cytology for intraoperative diagnosis of sentin. *Ann Surg*. 2008;247(5):839–42.
105. Jahromi AH, Narayanan S, MacNeill F, Osin P, Nerurkar A, Gul G. Testing the feasibility of infra-operative sentinel lymph node touch imprint cytology. *Ann R Coll Surg Engl*. 2009;91:336–9.
106. Julian T, Blumencranz P, Deck K, Whitworth P, Berry D, Berry S, et al. Novel intraoperative molecular test for sentinel lymph node metastases in patients with early-stage breast cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26(20):3338–45.
107. Viale G, Mastropasqua MG, Maiorano E, Mazzarol G. Pathologic examination of the axillary sentinel lymph nodes in patients with early-stage breast carcinoma: Current and resolving controversies on the basis of the European Institute of Oncology experience. *Virchows Arch*. 2006;448(3):241–7.
108. Barranger E, Antoine M, Grahek D, Callard P, Uzan S. Intraoperative imprint cytology of sentinel nodes in breast cancer. *J Surg Oncol*. 2004;86:128–33.
109. Chicken D, Kocjan G, Falzon M, Lee A, Douek M, Sainsbury R, et al. Intraoperative touch imprint cytology for the diagnosis of sentinel. *Br J Surg*. 2006;93(5):572–6.

110. Nagashima T, Suzuki M, Yagata H, Nikaido T, Horiuchi F, Koda K, et al. Intraoperative cytologic diagnosis of sentinel node metastases in breast cancer. *Acta Cytol.* 2003;47(6):1028–32.
111. Motomura K, Inaji H, Komoike Y, Kasugai T, Nagumo S, Noguchi S, et al. Intraoperative sentinel lymph node examination by imprint cytology. 2000;87(5):597–601.
112. Fujishima M, Watatani M, Inui H, Hashimoto Y, Yamamoto N, Hojo T, et al. Touch imprint cytology with cytokeratin immunostaining versus Papanicolaou staining for intraoperative evaluation of sentinel lymph node metastasis in clinically node-negative breast cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2009;35(4):398–402.
113. Clarke D, Leung E, Chachlani N, Rowlands D, Simon J, Hero I, et al. Intraoperative assessment of sentinel node using imprint cytology. *World Journal of Surgery.* 2010. p. 55–61.
114. Tafe L, Schwab M, Lefferts J, Wells W, Tsongalis G. A validation study of a new molecular diagnostic assay: the Dartmouth-Hitchcock Medical Center experience with the GeneSearch BLN assay in breast sentinel lymph nodes. *Exp Mol Pathol.* 2010;88(1):1–6.
115. Martin Martinez MD, Veys I, Majjaj S, Lespagnard L, Schobbens JC, Rouas G, et al. Clinical validation of a molecular assay for intra-operative detection of metastases in breast sentinel lymph nodes. *Eur J Surg Oncol.* 2009 Apr;35(4):387–92.
116. Visser M, Jiwa M, Horstman A, Brink A a TP, Pol RP, Van Diest P, et al. Intra-operative rapid diagnostic method based on CK19 mRNA expression for the detection of lymph node metastases in breast cancer. *Int J Cancer.* 2008;122(December 2007):2562–7.
117. Schem C, Maassv N, Bauerschlag D, Carstensen M, Löning T, Roder C, et al. One-step nucleic acid amplification-a molecular method for the detection of lymph node metastases in breast cancer patients; results of the German study group. *Virchows Arch.* 2009;454(2):203–10.
118. Tamaki Y, Akiyama F, Iwase T, Kaneko T, Tsuda H, Sato K, et al. Molecular detection of lymph node metastases in breast cancer patients: results of a multicenter trial using the one-step nucleic acid amplification assay. *Clin Cancer Res.* 2009;15(8):2879–84.

119. NICE. National Institute for Health and Care Excellence. Diagnostics consultation document. Intraoperative tests (RD-100i OSNA system and Metasin test) for detecting sentinel lymph node metastases in breast cancer. 2013. p. 1–37.
120. CQID. The Japanese Breast Cancer Society. Clinical practice guideline of breast cancer. Is the sentinel lymph node analysis recommendable? 2013.
121. Cserni G. Intraoperative analysis of sentinel lymph nodes in breast cancer by one-step nucleic acid amplification. *J Clin Pathol*. 2012;65:193–9.
122. Tsujimoto M, Nakabayashi K, Yoshidome K, Kaneko T, Iwase T, Akiyama F, et al. One-step nucleic acid amplification for intraoperative detection of lymph node metastasis in breast cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2007;13(16):4807–16.
123. Laia BV, Marcos MB, Refael CM, Francisco SC, Jose T, Blai BS, et al. Molecular Diagnosis of Sentinel Lymph Nodes for Breast Cancer. *Diagnostic Molecular Pathology*. 2011. p. 18–21.
124. Alvarenga C, Paravidino P, Alvarenga M, Dufloth R, Gomes M, Zeferino L, et al. Expression of CK19 in invasive breast carcinomas of special histological types: implications for the use of one-step nucleic acid amplification. *J Clin Pathol*. 2011;64(6):493–7.
125. Tan V, Goh B, Fook-Chong S, Khin L, Wong W, Yong W. The feasibility and accuracy of sentinel lymph node biopsy for breast carcinoma. *Am Surg*. 2011;104(1):97–103.

11. ANEXOS



Hospital Clínico San Carlos



11.1 Estudio integridad de RNA

Para comprobar la integridad del RNA corrimos el RNA total en un gel de agarosa al 1% en condiciones desnaturalizantes. Teñimos con bromuro de etidio y expusimos a radiación ultravioleta. Observamos las bandas correspondientes a las subunidades 28S y 18S del RNA ribosómico.

GEL DE AGAROSA AL 1% Y FORMALDEHIDO 12.3M 16%

Preparación del gel de agarosa al 1% (30 ml)

1. 24 ml de agua tratada con DEPC
2. 0.3 gramos de agarosa

Calentar en microondas

1. 3 ml de MOPS (10X)
2. 4.6 ml de formaldehido 37%
3. 3 μ L de Br Et (1mg/ml)

Preparación del buffer (250ml)

1. 225 ml de agua tratada con DEPC
2. 25 ml de MOPS 10 X

Preparación de las muestras

1. 15 μ L de RNA extraído de tejido (10 μ L si es hígado)
2. 5 μ L MOPS 1X
3. 2 μ L de buffer de carga
4. Calentar 15 minutos a 65 °C
5. Preelectroforesis 5 minutos a 55 V
6. Electroforesis de 1 hora a 35 V

⚠Nota: si al exponer el gel a la luz UV se observa mucha interferencia (mancha rosácea que impide ver con claridad la gel) puede dejarse el gel durante 1 hora más o menos, en agua fría y volver a verlo.



11.2 Extracción de RNA en tejido

QIAGEN

1. Disgregar entre 20 y 30 mg de tejido con el pestle en un volumen de 600 μ L de buffer RTL α . Posteriormente homogenizar el lisado usando aguja 20-G ($\varnothing$ 0.9 mm) y una jeringuilla (pasar el lisado a través de la aguja al menos 5 veces).

α Nota: añadir β -mercaptoetanol (β -ME) al buffer RTL antes de usar. Añadir 10 μ L de β -ME por 1 ml de buffer RTL.

2. Centrifugar el lisado durante 3 minutos a 16.000 x g (13000 rpm) en una microfuga. Recoger el sobrenadante y usarlo en los pasos siguientes.
3. Añadir un volumen de etanol al 70% para limpiar el lisado y mezclar bien con la pipeta.
4. Depositar 700 μ L de la muestra, incluyendo cualquier precipitado que pueda haberse formado, en una columna "RN easy mini spin" acoplada a un tubo colector de 2 ml. Centrifugar durante 15 segundos a $\geq$ 8000 x g ($\geq$ 10000 rpm). (Si el volumen de muestra excede de 700 μ L, volver a cargar el resto en la misma columna y repetir el proceso. Previamente descartar el líquido que ha pasado.) Reutilizar el mismo tubo colector en el paso 5.
5. Pipetear 700 μ L de buffer RW1 en la columna y centrifugar durante 15 segundos a $\geq$ 8000 x g ($\geq$ 10000 rpm) para lavar. Descartar el tubo colector y el líquido que ha pasado.
6. Acoplar la columna a un nuevo tubo colector de 2 ml. Pipetear 500 μ L de buffer RPE α en dicha columna y centrifugar durante 15 segundos a $\geq$ 8000 x g ($\geq$ 10000 rpm) para lavar. Descartar el líquido del tubo colector y reutilizar este último en el paso 7.

α Nota: preparación del buffer RPE. Añadir 4 volúmenes de etanol (96-100%) en la

botella de buffer concentrado para obtener una solución de trabajo.

7. Pipetear 500 μ L buffer RPE en la columna y centrifugar durante 2 minutos a 16000 x g (13000 rpm) para secar la membrana.

8. Acoplar la columna a un nuevo tubo colector de 1.5 ml y pipetear 50 μ L de agua destilada estéril directamente en la membrana. Centrifugar durante 1 minuto a ≥ 8000 x g (≥ 10000 rpm) para eluir el RNA. Repetir si la cantidad de RNA esperada es > 30 μ g. recoger el volumen en el mismo tubo colector.

- Cuantificación del RNA total (hacer la cuantificación de RNA en agua)
La concentración y pureza del RNA puede ser determinada midiendo la absorbancia a 260nm (A_{260}) y 280 nm (A_{280}) en un espectrofotómetro. La lectura a 260 nm mide la concentración de RNA y debe ser superior a 0.15

1 unidad de absorbancia a 260 nm = 40 μ g/ml

- Dilución para cuantificar el RNA
495 μ L de agua destilada estéril + 5 μ L de la muestra (1:100)

[RNA total] = $40 \times A_{260} \times FD$ (100)

Guardar el RNA a -70 °C



11.3. Preparación de geles poliacrilamida

Se cargan muestras WT, MUT, HET, BLANCO, 2 PACIENTES.

POLIACRILAMIDA AL 12%

1. Se realiza la mezcla en el tubo tapón amarillo.
2. H₂O destilada se agregan 5.34 ml con pipeta.
3. TBE al 5% (frasco blanco): 1.6 ml- está al 10% por ello 0.8 ml son 10x mas 0.8 ml de H₂O destilada o así 800µL de TBE al 10% mas 800 µL de H₂O destilada
4. Acrilamida (frasco con aluminio, nevera): 3ml
5. APS (frasco en la nevera): 58 µL, si caduca los pocillos no polimerizan bien.
Se prepara 1g de persulfato de amonio y 10 ml de H₂O destilada
6. TEMED (caja plástica en nevera): 3.5 µL

La polimerización del gel se realiza en 30 minutos.

POLIACRILAMIDA AL 10%

1. Se realiza la mezcla en el tubo tapón amarillo.
2. H₂O se agregan 5.83 ml con pipeta.
3. TBE al 5% (frasco blanco): 1.6 ml- está al 10% por ello 0.8 ml son 10x mas 0.8 ml de H₂O destilada o así 800µL de TBE al 10% mas 800 µL de H₂O destilada
4. Acrilamida (frasco con aluminio, nevera): 2.5 ml
5. APS (frasco en la nevera): 58 µL, si caduca los pocillos no polimerizan bien.
Se prepara 1g de persulfato de amonio y 10 ml de H₂O destilada
6. TEMED (caja plástica en nevera): 3.5 µL

POLIACRILAMIDA AL 8%

1. Se realiza la mezcla en el tubo tapón amarillo.

2. H₂O se agregan 7.14 ml con pipeta.
3. TBE al 5% (frasco blanco): 1.6 ml- está al 10% por ello 0.8 ml son 10x mas 0.8 ml de H₂O destilada o así 800µL de TBE al 10% mas 800 µL de H₂O destilada
4. Acrilamida (frasco con aluminio, nevera): 2 ml
5. APS (frasco en la nevera): 58 µL, si caduca los pocillos no polimerizan bien. Se prepara 1g de persulfato de amonio y 10 ml de H₂O destilada
6. TEMED (caja plástica en nevera): 3.5 µL

CASSETTE

1. Soporte + servilleta + casete encima.
2. Al echar el gel se hace apoyo en la punta azul sobre el casete (ángulo superior) y se deja que el gel entre solo entre las paredes (sin burbujas). Se echa hasta que rebasa un poquito y se mete el peine.
3. Lo que queda en el tubo sirve para saber cuándo ha finalizado la polimerización, (se tapa el tubo) por 30 minutos. Debe estar solido y frio.
4. Se quita el peine, se lava con H₂O destilada y se secan los pocillos (flecos de papel filtro)

MONTAR LA CUBETA

Montar la cubeta con el gel (recubrir con buffer 1%), se guarda en nevera y cargar con la muestra preparada.

PREPARACION DE MUESTRAS

1. Muestras: 8 µL amplificado y 4 µL de buffer (azul).
2. Marcador: 15 µL marcador y 1.5 µL de buffer (azul).

CARGAR EL GEL

1. Si se cargan dos geles no poner el marcador y B en la misma posición.

CONECTAR A LA FUENTE

1. 110 a 130 voltios en 60 minutos.
2. Hasta que llegue a la mitad del gel.

REVELADO

1. Echar el gel en la cubeta con TBE al 1% (limpio) y EtBr bromuro de Etidio (1ml o 0.5 ml). Equipo BIOMERIEUX durante 10 minutos a 120 rpm.
2. Ver a la luz ultravioleta.
 - Se prepara TBE 1Xa partir de TBE 10X: 90 ml de H₂O y 10 ml TBE 1X
 - Para hacer 500 ml:
100 ml → TBE 10X
500ml → x
x=50 TBE 10X equivale a TBE 1X
450 H₂O

11.4 Protocolo de Amplificación de DNAC de Citoqueratina 19

OneStep RT-PCR Kit QIAGEN

- Mezcla de la reacción:

Volumen total: 25 μ L. (Aunque el kit indique un volumen final de 50 μ L, la reacción sale con la mitad de los reactivos.

216 pb

Primer Sense: 5' -TGA GCA GGT CCG AGG TTA-3'

AntiSense: 5' -TGA TAG TGA GCG GCA GAA TCA GG-3'

REACTIVOS	VOLUMEN (μ L)	CONCENTRACION FINAL
Agua sin RNAsas	1 μ L	-
5x buffer	5 μ L	1X
d Ntp mix	1 μ L	400 mM de cada dNTP
Primer R	1 μ L	0.6 μ M
PrimerF	1 μ L	0.6 μ M
Enzyme mix	1 μ L	-
RNA	5 μ L	

- El agua es mejor añadirlo a la mezcla y después añadir el RNA. Se puede añadir un inhibidor de RNAsas, 5-10 U\ reacción.
- CONDICIONES DE AMPLIFICACION:

La Hotstar Taq Polymerase, incluida en el mix de enzimas, requiere una activación inicia a 95 °C durante 15 minutos.

Iniciar el programa en le termociclador sin meter los tubos de la reacción y cuando se hayan alcanzado los 50 grados, poner el termociclador en pausa e introducir los tubos.

1 ciclo de:	50°C	durante	30
1 ciclo de:	95 °C	durante	15
	minutos		
30 ciclos	94 °C	durante	30
	segundos		

	60°C	durante	30
	segundos		
	72 °C	durante	1 minuto
1 ciclo:	72 °C	durante	10 minutos
1 ciclo	4 °C	indefinido	

METH 93

Los amplificadores pueden estar toda la noche en la nevera a 4 °C, y si no hay que congelarlos.

- ELECTROFORESIS

Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%.
130 V durante 70 minutos.



11.5 Protocolo de amplificación de DNAC mamaglobina

OneStep RT-PCR Kit QIAGEN

- Mezcla de la reacción:

Volumen total: 25 µL. (Aunque el kit indique un volumen final de 50 µL, la reacción sale con la mitad de los reactivos.

105 pb

Primer Sense: 5' -CAA ACG GAT GAA ACT CTG AGC AAT GTT GA-3'

Antisense: 5' - TCT GTG AGC CAA AGC CAA AGG TCT TGC AGA-3'

REACTIVOS	VOLUMEN (µL)	CONCENTRACION FINAL
Agua sin RNAsas	11µl	-
5x buffer	5µl	1X
d Ntp mix	1µl	400 mM de cada dNTP
Primer R	1µl	0.6µM
PrimerF	1µl	0.6µM
Enzyme mix	1µl	-
RNA	5µl	

- El agua es mejor añadirlo a la mezcla y después añadir el RNA. Se puede añadir un inhibidor de RNAsas, 5-10 U\ reacción.

○ CONDICIONES DE AMPLIFICACION:

La Hotstar Taq Polymerase, incluida en el mix de enzimas, requiere una activación inicia a 95 °C durante 15 minutos.

Iniciar el programa en le termociclador sin meter los tubos de la reacción y cuando se hayan alcanzado los 50 grados, poner el termociclador en pausa e introducir los tubos.

1 ciclo de:	50°C	durante	30
1 ciclo de:	minutos		
	95 °C	durante	15

	minutos
30 ciclos	94 °C durante 30 segundos 65°C durante 30 segundos 72 °C durante 1 minuto
1 ciclo:	72 °C durante 10 minutos
1 ciclo	4 °C indefinido

METH 67

Los amplificadores pueden estar toda la noche en la nevera a 4 °C, y si no hay que congelarlos.

- ELECTROFORESIS

Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%.
130 V durante 70 minutos.

- Otros primers: (107 pb)

Primer Sense: 5' -CGG ATG AAA CTC TGA GCAATG T-3'

Antisense: 5' - CTG CAG TTC TGT GAG CCA AAG-3'

Los primeros no funcionan bien en el Smart Cycler, parece que dimerizan y por eso se pidieron estos, pero no se llegaron a probar en el Smart Cycler. Con estos primers también funciona la técnica, y se hace todo igual pero en la amplificación, la temperatura de annealing es de 55 °C.

11.6 Aval ético



Informe Dictamen Protocolo Favorable
Otros Estudios

C.P. - C.I. 11/031-E

14 de febrero de 2011

CEIC Area 7 - Hospital Clínico San Carlos

INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

DÑA M^a DEL MAR GARCÍA ARENILLAS, SECRETARIA DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DEL HOSPITAL CLÍNICO SAN CARLOS DE MADRID.

CERTIFICA

Que en el estudio titulado: "**Estudio molecular de micrometástasis en ganglio centinela. Valor pronóstico**" con código Interno: 11/031-E.

- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Es adecuado el procedimiento para obtener el consentimiento informado.
- La capacidad del investigador y los medios disponibles son adecuados para llevar a cabo el estudio.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto de los postulados éticos.

Es por ello que el Comité **informa favorablemente** sobre la realización de dicho proyecto por la **Dra. M^a Luisa Maestro de las Casas**, del Servicio de Análisis Clínicos, del Hospital Clínico San Carlos como Investigadora Principal.

Lo que firmo en Madrid, a 14 de febrero de 2011

Fdo: Dra. Mar García Arenillas
Secretaria del CEIC Area 7 - Hospital Clínico San Carlos

11.7 Artículo publicado 1

Artículo de Investigación

COMPARACIÓN ENTRE DIFERENTES TÉCNICAS DE ESTUDIO DEL GANGLIO CENTINELA DESPUÉS DE NEOADYUVANCIA EN CÁNCER DE MAMA

A COMPARISON BETWEEN DIFFERENT SENTINEL NODE DETECTION TECHNIQUES AFTER NEOADJUVANCY IN BREAST CANCER

Luz Fernanda Sua Villegas¹, Virginia de la Orden García²,
Sara Rafael Fernández², Silvia Vezanones de Castro², Marta Vidaurreta Lázaro²,
M^a Luisa Maestro de las Casas², José M. Román³

RESUMEN

Introducción. El papel de la biopsia del ganglio centinela realizada después de quimioterapia neoadyuvante es controvertido. El objetivo del presente estudio es analizar el valor del ganglio centinela en los tumores de mama avanzados que han recibido neoadyuvancia y estudiarlos con técnicas de hematoxilina y eosina, inmunohistoquímica y molecular de reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). **Material y métodos.** Un total de 33 pacientes fueron incluidas en el estudio; estas enfermas recibieron neoadyuvancia y se les realizó la técnica del ganglio centinela. Una vez extraído el ganglio, éste era enviado a anatomía

patológica, donde era evaluado y posteriormente se fragmentaba, utilizando entre un 25% y 50% del ganglio para el estudio en el laboratorio de biología molecular. **Resultados.** Los ganglios centinelas se estudiaron con las técnicas de hematoxilina y eosina, inmunohistoquímica y la molecular, encontrando un incremento de la sensibilidad con la última técnica, la del RT-PCR. Los ganglios centinelas fueron negativos en un 45.1% y las linfadenectomías fueron negativas en un 61.3% después de neoadyuvancia. Las recidivas locales a 5 años equivalen al 8.3%. Para nuestra serie la tasa de supervivencia libre de enfermedad a 5 años en estadio II es del 100% y en estadio III es del 87.5%. **Conclusión.** Existe un escaso número de pacientes estudiadas, sin

¹ MD, Departamento de Anatomía Patológica y Patología Clínica. Universidad del Valle. Cali, Colombia.

² Servicio de Análisis Clínicos, Laboratorio de Genómica. Hospital Clínico San Carlos. Madrid, España.

³ MD, Servicio de Ginecología y Obstetricia, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, España.

11.8 Artículo publicado 2

Colombia Médica

Vol. 43 N° 1, 2012 (Enero-Marzo)

Rapid detection of sentinel lymph node metastases in different techniques and comparison in low-grade breast carcinomas

Detección rápida de metástasis en ganglio centinela y comparación de diferentes técnicas en carcinomas de mama de bajo grado

Summary

Introduction: The role of sentinel node biopsy has revolutionized breast cancer treatment. This determination reduces the mobility of a complete axillary lymphadenectomy. The aim of our study is to analyze the value of sentinel node in low-grade histological breast tumors, studied with hematoxylin and eosin techniques, Immunohistochemistry, and molecular chain reaction in real-time quantitative polymerase (RT-PCR).

Materials and methods: In a pilot study we studied a total of 21 patients with histological diagnosis of mucinous carcinoma, adenoid cystic carcinoma, and medullar carcinoma that underwent the sentinel node technique. Once the lymph node was removed, it was sent to pathology, where it was fragmented and evaluated, using between 25% and 50% of the lymph node for molecular biology laboratory studies.

Results: The sentinel nodes studied were 32, corresponding to the 21 patients. Of the 32 lymph nodes analyzed, 29 (90.6%) were negative on histopathological examination and the molecular identification, 2 (6.2%) were positive in both techniques and 1 (3.125%) lymph node was positive with quantitative RT-PCR and negative in histology (H&E), which – subsequently by immunohistochemistry (IHC) – was diagnosed as isolated tumor cells (ITC).

Conclusion: When comparing the techniques of hematoxylin and eosin, immunohistochemistry, and molecular RT-PCR technique, we found greater sensitivity of molecular techniques; this can reduce the false negative and improve diagnosis of sentinel node metastases. Patients with low histological grade carcinomas have high survival rates, less aggressive tumor behavior, and reduced lymph node at diagnosis.

Keywords Lymphatic metastasis; Breast neoplasm; Polymerase chain reaction; Biopsy; Immunohistochemistry; Lymph node excision.

Colomb Med. 2012; 43: 28-37

11.9 Artículo publicado 3

USO DE NUEVAS METODOLOGÍAS EN LA PRÁCTICA CLÍNICA: ESTUDIO DE LA AMPLIFICACIÓN DEL ONCOGÉN HER2 CON HIBRIDACIÓN *IN SITU* CROMOGENICA Y CON PLATA (DUAL ISH) EN EL CÁNCER DE MAMA

Luz Fernanda Sua¹, Juan Carlos Bravo², William Franco³

RESUMEN

Introducción: La determinación del oncogén HER2 es crítica en las pacientes que responderán al anticuerpo monoclonal humanizado Trastuzumab. La técnica de hibridación *in situ* cromogénica y con plata (Dual ISH) ha sido exitosamente probada en la detección de la amplificación del gen HER2, un importante biomarcador del cáncer de mama que combina las ventajas de la automatización y la microscopía de luz, mejorando el flujo de trabajo en el laboratorio. **Objetivos:** verificar si la metodología automatizada de hibridación *in situ* cromogénica y con plata (Dual ISH) realizada en el equipo Benchmark XT de Ventana Medical Systems® puede ser comparable con la hibridación *in situ* fluorescente (FISH) en casos de la Fundación Valle del Lili. **Metodología:** Previa aprobación del Comité de Ética de la Fundación Valle del Lili, evaluamos un total de 42 casos, encontrando 98.1% con un nivel de concordancia total, tanto de la hibridación *in situ* fluorescente (FISH) y de la inmunohistoquímica (IHQ) con el ISH Dual. Determinamos un nivel de concordancia del 94.4% en el estudio del nivel de amplificación del gen HER2 por FISH y por ISH Dual. La concordancia entre la determinación de la expresión de la proteína HER2 por IHQ y por ISH Dual fue del 100%. Al evaluar nuestro coeficiente Kappa este fue de 0.97 y nuestro coeficiente de correlación intraclases en referencia con el FISH fue casi perfecto 0.85. **Conclusión:** nosotros observamos una reducción del tiempo de procesamiento con la técnica Dual ISH al ser una metodología automatizada (Equipo BenchMark XT de Ventana®) cuando la comparamos con el protocolo FISH. La técnica Dual ISH permite la evaluación morfológica y estudia simultáneamente el centrómero del cromosoma 17 y el oncogén HER2. Esta metodología se estudia en el microscopio de luz (60x), es cuantitativa, se puede archivar y se encuentra aprobada por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA).

Palabras clave: HER2, hibridación, cáncer de mama.

11.10 Artículo publicado 4

ESTUDIOS DE PATOLOGÍA MOLECULAR UTILIZADOS PARA EVALUAR LA AMPLIFICACIÓN DEL ONCOGÉN HER2 EN CÁNCER DE MAMA. OPINIÓN CLÍNICA

Luz Fernanda Sua MD¹, Juan Carlos Bravo MD², William Franco³

RESUMEN

La importancia en la detección de la amplificación de oncogén HER2, es esencial en el cáncer de mama puesto que estas pacientes no responden a los tratamientos de quimioterapia y hormonales convencionales, traduciéndose así en una menor supervivencia. La determinación del oncogén HER2 tiene un papel crucial como diana terapéutica del trastuzumab. A continuación describiremos estas metodologías las cuales son: la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH), la hibridación *in situ* cromogénica (CISH) y la técnica hibridación *in situ* cromogénica y con plata (Dual ISH), métodos usados para el estudio del oncogén HER2, en la selección correcta de las pacientes con cáncer de mama que son candidatas a recibir trastuzumab, teniendo una gran utilidad e impacto clínico.

Palabras clave: Amplificación HER2, Hibridación *in situ* fluorescente (FISH), Hibridación *in situ* cromogénica (CISH) e Hibridación *in situ* cromogénica y con plata (DISH).

ISSN: 0120-5498 • MEDICINA (Bogotá) Vol. 36 No. 4 (107) Págs. 320-328 • Diciembre 2014