

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



TESIS DOCTORAL

**Detección molecular de micrometástasis en ganglio centinela: valor
pronóstico**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Virginia de la Orden García

Directores

María Luisa Maestro

Marta Vidaurreta

Silvia Veganzones

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



**DETECCIÓN MOLECULAR DE
MICROMETÁSTASIS EN GANGLIO
CENTINELA. VALOR PRONÓSTICO.**

TESIS DOCTORAL

VIRGINIA DE LA ORDEN GARCÍA

Madrid 2015

DETECCIÓN MOLECULAR DE MICROMETÁSTASIS EN GANGLIO CENTINELA. VALOR PRONÓSTICO.

Virginia de la Orden García.

Tesis Doctoral

Universidad Complutense de Madrid.

DIRECTORAS

Dra. María Luisa Maestro

Dra. Marta Vidaurreta

Dra. Silvia Veganzones

Dra. Ciencias Biológicas

Dra. Ciencias Químicas

Dra. Ciencias Biológicas

Facultativo Especialista

Hospital Clínico San Carlos.

Instituto de Investigación

Hospital Clínico San Carlos.

Sanitaria San Carlos.

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
HOSPITAL CLÍNICO SAN CARLOS**

Dra. **María Luisa Maestro de las Casas**, Doctora en CC. Biológicas por la Universidad Complutense de Madrid.

Dra. **Marta Vidaurreta Lázaro**, Doctora en CC. Químicas por la Universidad Complutense de Madrid.

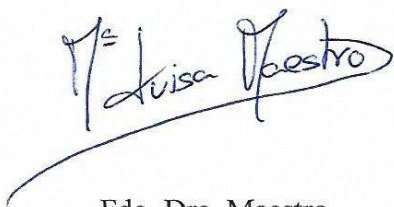
Dra. **Silvia Veganzones de Castro**, Doctora en CC. Biológicas por la Universidad Complutense de Madrid.

INFORMAN:

Que la tesis titulada: “**Detección molecular de micrometástasis en ganglio centinela. Valor pronóstico.**”, de la que es autora Dña. **Virginia de la Orden García**, licenciada en CC. Biológicas por la Universidad de Alcalá de Henares (Madrid), ha sido realizada bajo nuestra dirección y cumple las condiciones exigidas para ser presentada a efectos de ser juzgada.

CODIGO: 032659

Madrid, a 4 de Septiembre de 2015.



Fdo. Dra. Maestro.



Fdo. Dra. Vidaurreta




Fdo. Dra. Veganzones



Heimdall es el dios de la luz, el centinela de todos los dioses ya que, desde los bordes del cielo, vigila Bifrost, el puente del arco Iris, que es la única entrada a Asgard. Lo guarda para evitar que los gigantes lo tomen por la fuerza.

Mitos Nórdicos, R.I. Page. 1992.



*"Sometimes you pay with your sweat
Fighting back the tears
Put in more than you get
It seems you throw away the years
Had my moments of doubt
Well, I'm proud to say
Don't go counting me out
We're gonna get ready"*

EUROPE. Gonna get ready (Last look at Eden, 2009)

A mis padres y a Raúl

A la memoria de Vicenta

Agradecimientos

Más de 8 años hace desde que dejé un contrato fijo en un laboratorio farmacéutico para aceptar una beca como investigadora. Era un cambio arriesgado, pero también la oportunidad de adentrarme en aquello que había deseado desde que de niña dije a mis padres que quería estudiar "bichos y genes" y trasteaba con el microscopio de juguete de mi hermano. Di el paso y ahora sé que acerté al tomar la decisión de iniciar este camino que, aunque duro en ocasiones, me ha llevado a realizar este trabajo de investigación y que ha marcado por ello una etapa en mi vida.

A lo largo de ese camino no han sido pocas las personas que me han ayudado, brindándome sus conocimientos, experiencia y apoyo a nivel personal. A todas ellas me gustaría agradecerles su importante contribución.

En especial, a la Dra. Marisa Maestro, directora de esta tesis, cuya contribución no solo ha sido a nivel científico y profesional, sino también a nivel personal. A ella le estaré siempre agradecida por darme esta oportunidad y por luchar incansablemente por mi continuidad en el laboratorio. Su carácter apasionado y espíritu de lucha son muy culpables de la feliz culminación de este trabajo.

A mi codirectora, la Dra. Marta Vidaurreta, que ha desarrollado un papel indispensable en la elaboración de esta tesis doctoral. Una persona incombustible, enérgica y capaz, tanto dentro como fuera del laboratorio. Gracias por tu paciencia y tiempo.

A la Dra. Silvia Veganzones, también codirectora de esta tesis, por su paciencia, dedicación y constante apoyo durante el desarrollo de este trabajo, del cual también fue parte importante en la etapa de inicio. Gracias por compartir tus conocimientos y experiencia.

A la Dra. Sara Rafael, siempre dispuesta a hacernos partícipes de su mentalidad científica y capacidad docente, siempre cercana y compañera. Gracias por ayudarme a estructurar mi mente.

A Beatriz Mediero, pieza indispensable que completa este extraordinario equipo, con su inmensa capacidad de trabajo, destreza y autonomía, consigue que todo funcione como si fuera fácil. Gracias por tu apoyo, alegría y risas compartidas.

Quiero agradecer a la Dra. Cristina Fernández su gran paciencia, disponibilidad, e implicación en este proyecto, así como su valiosa ayuda en la comprensión de las técnicas estadísticas.

No menos importante ha sido la ayuda recibida fuera del laboratorio y que también me gustaría agradecer.

A Raúl, que casi sin darme cuenta se ha convertido en la pieza que completa el puzle. Gracias por ser partícipe de esta difícil etapa, por tu apoyo a todos los niveles y por tu capacidad de aportarme siempre justo lo que necesito cuando ni yo sabía lo que necesitaba.

A mis padres, Benito y Ángela, pilar indispensable en mi vida y red de seguridad a la hora de correr el riesgo de perseguir mis metas. Por su apoyo incondicional y confianza. Cualquier logro conseguido tiene su base en vuestro amor y cariño.

A Gustavo, por ejercer siempre como buen hermano mayor, emprendedor y capaz de materializar sus propias ideas. Gracias por ser un referente y parte importante en mi vida.

A mis amigas, unas biólogas y otras no, las primeras por compartir y entender esta experiencia y, a todas por su constante ánimo y por no tener en cuenta mi desaparición del mundo durante meses.

Y, en definitiva, a todas aquellas personas que, a lo largo de mi vida académica, profesional y personal, han contribuido de una manera o de otra, a que hoy me encuentre consiguiendo este reto.

ÍNDICES

ÍNDICE DE CONTENIDOS**Página****RESUMEN****III****SUMMARY****XI****INTRODUCCIÓN****3****I. EPIDEMIOLOGÍA****3**

I.A Incidencia

3

I.B. Mortalidad

12

I.C. Supervivencia

15**II. ETIOPATOGENIA****17**

II.A. Formas de presentación

17

II.B. Factores de riesgo

17

II.B.1. Sexo

18

II.B.2. Edad

18

II.B.3. Factores geográficos

18

II.B.4. Edad de menarquia y menopausia

19

II.B.5. Edad de primer embarazo

19

II.B.6. Lactancia materna

20

II.B.7. Historia Familiar

20

II.B.8. Antecedentes de patología mamaria benigna

22

II.B.9. Riesgos histológicos

22

II.B.10. Radiación

23

II.B.11. Estilo de vida

23

II.B.12. Contraceptivos orales

25

II.B.13. Terapia hormonal sustitutiva	25
III. EVOLUCIÓN HISTÓRICA DEL TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE MAMA	27
III.A. Evolución histórica	27
III.B. Desarrollo de la disección axilar	40
III.C. Técnica de biopsia selectiva del ganglio centinela	41
III.D. Clasificación TNM	43
III.E. Técnicas inmunohistoquímicas en el carcinoma mamario	47
III.E.1. Marcadores genéticos	48
III.E.2. Otros marcadores	48
III.F. Técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en el ganglio centinela	49
IV. HISTORIA NATURAL DEL CÁNCER DE MAMA	53
IV.A. Crecimiento intramamario	53
IV.B. Diseminación ganglionar	55
IV.B.1 Vía axilar	56
IV.B.2 Vía de la mamaria interna.	58
IV.C. Metástasis	59
IV.D. Micrometástasis y técnicas utilizadas para su detección	62
V. CONCEPTOS GENERALES EN CÁNCER DE MAMA	65
V.A. Diagnóstico clínico	65
V.A.1. Exploración clínica	65
V.B. Diagnóstico radiológico	65
V.B.1. Mamografía	65

V.B.2. Ecografía de mama	67
V.C. Procedimientos diagnósticos intervencionistas	67
V.C.1. Diagnóstico citológico	68
V.C.2. Diagnóstico histológico	68
V.C.3. Señalización de lesiones	68
V.D. Otros procedimientos diagnósticos	68
V.D.1. Galactografía	68
V.D.2. Resonancia magnética de mama	69
V.D.3. Linfogramagrafía	69
V.D.4. PET o PET-TAC y SPECT-TAC	69
V.E. Diagnóstico anatomopatológico	70
V.E.1. La punción aspiración con aguja fina (PAAF)	70
V.E.2. Biopsia con aguja gruesa (BAG)	71
VI. FUNDAMENTO DEL GANGLIO CENTINELA	72
VI.A. Inicio de los estudios	72
VI.B. Estudio de las metástasis en ganglio centinela	77
VII. FACTORES PRONÓSTICO DEL CÁNCER DE MAMA	79
VII.A. Factores pronóstico clásicos	80
VII.A.1. Afectación ganglionar	80
VII.A.2. Tamaño tumoral	82
VII.A.3. Grado Tumoral. Escala de ELSTON	82
VII.A.4. Tipo Tumoral	83
VII.A.5. Invasión del Estroma	83
VII.A.6. Invasión Vascular	83

VII.B. Factores pronóstico biológicos	84
VII.B.1. Cinética Celular	84
VII.B.2. Receptores Hormonales	85
VII.B.3. Sobreexpresión del oncogén HER-2neu	87
VII.B.4. Catepsina D	91
VII.B.5. Índice de proliferación: Ki67	91
VII.B.6. Gen p53	92
VII.B.7. Activadores del sistema uroquinasa- plasminógeno	93
VII.B.8. Susceptibilidad Genética	93
VII.B.9. Perfiles Genéticos en el Cáncer de Mama	95
VII.B.10. Mamaglobina	96
VII.B.11. Citoqueratina 19	101

OBJETIVOS	111
------------------	-----

PACIENTES Y MÉTODO	115
---------------------------	-----

I. PACIENTES	115
---------------------	-----

I.A. Periodo de estudio	115
-------------------------	-----

I.B. Población de estudio	115
---------------------------	-----

II. MÉTODO	118
-------------------	-----

II.A. Metodología Clínica	118
---------------------------	-----

II.B. Metodología Analítica	121
-----------------------------	-----

II.B.1. Técnica RT-PCR convencional	122
-------------------------------------	-----

II.B.2. Técnica RT-PCR a tiempo real	127
--------------------------------------	-----

II.C Metodología estadística	131
RESULTADOS	137
I. ESTUDIO DESCRIPTIVO DE LA POBLACIÓN	137
I.A. Tamaño muestral.	137
I.B. Edad	137
I.C. Técnica de Hematoxilina y Eosina.	138
I.D. Técnica Inmunohistoquímica	138
I.E. Antecedentes genésicos	139
I.F. Antecedentes familiares	139
I.G. Antecedentes personales de patología benigna	140
I.H. Afectación ganglionar	140
I.I. Número de ganglios centinela detectados	141
I.J. Tamaño de la metástasis ganglionar	142
I.K. Linfadenectomía	143
I.L. Número de ganglios extraídos en la linfadenectomía	143
I.M. Número de ganglios positivos en la linfadenectomía	144
I.N. Tamaño del tumor primario	144
I.Ñ. Grado tumoral. Escala de ELSTON	145
I.O. Tipo histológico	146
I.P. Estadío tumoral	147
I.Q. Receptores de estrógenos	148
I.R. Receptores de progesterona	149
I.S. Índice de proliferación Ki67	150
I.T. Oncogén HER-2neu	151

II. ESTUDIO Y COMPARACIÓN DE LA MAMAGLOBINA Y CITOQUERATINA 19 OBTENIDOS MEDIANTE RT-PCR CONVENCIONAL Y RT-PCR A TIEMPO REAL	152
III. ANÁLISIS DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA RT-PCR DE LOS GENES MAMAGLOBINA Y CITOQUERATINA 19	155
IV. ESTUDIO DE LA RELACIÓN DE LA RT-PCR DE LOS MARCADORES MG Y CK19 CON LOS FACTORES PRONÓSTICO	159
IV.A. Factores pronóstico clásicos	159
IV.B. Factores pronóstico biológicos	164
V. ESTUDIO DE LA RELACIÓN DE LA RT-PCR DE LOS MARCADORES MG Y CK19 CON OTROS FACTORES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO	169
VI. ANÁLISIS DE LA FRECUENCIA Y ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE LAS VARIABLES GENÉTICAS	186
VII. SEGUIMIENTO POSTOPERATORIO DE LAS PACIENTES DE CARCINOMA DE MAMA EN ESTADIOS TEMPRANOS. ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA PRONÓSTICA: SUPERVIVENCIA GLOBAL	188
VII.A. Estudio de la supervivencia global	188
VII.B. Análisis univariable de la probabilidad acumulada de fallecer de las pacientes con cáncer de mama en estadios iniciales en relación con la técnica de biología molecular empleada: RT-PCR convencional	189

VII.C. Análisis univariable de la probabilidad acumulada de fallecer de las pacientes con cáncer de mama en estadios iniciales en relación con los factores pronóstico clásicos	190
VII.D. Análisis univariable de la probabilidad acumulada de fallecer de las pacientes con cáncer de mama en estadios iniciales en relación con los factores pronóstico biológicos	192
VII.E. Análisis univariable de la probabilidad acumulada de fallecer de las pacientes con cáncer de mama en estadios iniciales en relación con otros factores estudiados	195
VII.F. Análisis multivariable de la supervivencia global	199
VIII. SEGUIMIENTO POSTOPERATORIO DE LAS PACIENTES DE CARCINOMA DE MAMA EN ESTADIOS TEMPRANOS. ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA PRONÓSTICA: SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD	200
VIII.A. Estudio de la supervivencia libre de enfermedad	200
VIII.B. Análisis univariable de la probabilidad acumulada de recidivar de las pacientes con cáncer de mama en estadios iniciales en relación con la técnica de biología molecular empleada: RT-PCR convencional	201
VIII.C. Análisis univariable de la probabilidad acumulada de recidivar en las pacientes con cáncer de mama en estadios iniciales en relación con los factores pronóstico clásicos	202
VIII.D. Análisis univariable de la probabilidad acumulada de recidivar en las pacientes con cáncer de mama en estadios iniciales en relación con los factores pronóstico biológicos	205

VIII.E. Análisis univariable de la probabilidad acumulada de recidivar en las pacientes con cáncer de mama en estadios iniciales en relación con otros factores estudiados	208
VIII.F. Análisis multivariable de la supervivencia libre de enfermedad	213

DISCUSIÓN	217
CONCLUSIONES	247
BIBLIOGRAFÍA	253
ANEXO 1	307
ANEXO 2	309

ÍNDICE DE FIGURAS	Página
Figura 1: Valores de incidencia y mortalidad de los distintos tipos de cáncer para ambos sexos a nivel mundial.	4
Figura 2: Tasas de incidencia de cáncer de mama estandarizadas por edad en el mundo. Casos/100.000 mujeres/año. Año 2012. Población estándar mundial. GLOBOCAN.	5
Figura 3: Tasas estimadas de incidencia y mortalidad del cáncer de mama estandarizadas por edad (mundial) por 100.000. GLOBOCAN 2012.	7
Figura 4: Tasas de mortalidad de cáncer de mama estandarizadas por edad en el mundo. Casos/100.000 mujeres/año. Año 2012. Población estándar mundial. GLOBOCAN.	13
Figura 5: Tasa de mortalidad ajustada a la población europea por 100.000 habitantes del cáncer de mama en el sexo femenino en España. Año 2007. Centro Nacional de Epidemiología Instituto de Salud Carlos III.	15
Figura 6: Grabado del siglo XVII que representa a Santa Águeda con los pechos amputados y sobre una bandeja portada por un ángel. La mujer sujeta en la mano las tenazas de amputar. Dentro del recuadro aparecen otras tenazas similares tomadas de una obra de Sculteus de la misma época.	28
Figura 7: Amputación de una mama seguida de cauterización, tal como la ilustra Sculteus en su Armamentarium chirurgicum (1641).	30

Figura 8: Reconocimientos de los pechos según las prácticas descritas en el tratado de cirugía de Teodórico.	31
Figura 9: Técnica de mastectomía según Esculeto (1645).	32
Figura 10: Aparato para compresión de la mama, diseñado por Arnott.	35
Figura 11: Esquema de la técnica de mastectomía radical de Halsted.	37
Figura 12: Drenaje linfático según los niveles de Berg. Nivel I en amarillo, nivel II en azul y nivel III en verde. Otras vías de drenaje son, en rojo los ganglios de la cadena mamaria interna, en morado los ganglios de la zona supraclavicular y en azul otros ganglios.	57
Figura 13: Localización del gen de la mamaglobina A (MGA) y otros genes de la familia de las uteroglobinas en el cromosoma 11. SCGB: secretoglobinas.	97
Figura 14: Migración tras electroforesis observada mediante luz ultravioleta del ADN amplificado para la CK19, de cada paciente, y del marcador del peso molecular. Resultando positivos los casos situados en posición: 3, 4 y 9.	126
Figura 15: Migración tras electroforesis observada mediante luz ultravioleta del ADN amplificado para MG, de cada paciente, y del marcador del peso molecular. Resultando positivos para MG, los casos situados en posición: 6, 7 y 8.	127

Figura 16: Resultados obtenidos en el SmartCycler®. Visión en conjunto del control positivo (Id. del sitio A10 – morado), control negativo (Id. del sitio A11 – naranja), paciente 309 (Id. de sitio A12 – verde oscuro) con resultado negativo y paciente 310 (Id. de sitio A13 – verde claro) con resultado positivo.	130
Figura 17: Clasificación de la población en función de la media de edad.	137
Figura 18: Resultados obtenidos para la técnica de Hematoxilina-Eosina.	138
Figura 19: Resultados obtenidos de las 254 pacientes a la que se les realizó la técnica de IHQ.	139
Figura 20: Hallazgo o no de afectación en los ganglios.	141
Figura 21: Número de Ganglios Centinela detectados.	142
Figura 22: Tamaño de la metástasis encontrada en el ganglio.	143
Figura 23: Número de ganglios extraídos en la linfadenectomía.	144
Figura 24: Distribución de los tumores primarios según su tamaño.	145
Figura 25: Grado tumoral, según la escala de ELSTON.	146
Figura 26: Distribución de los tumores primarios según el tipo histológico.	147
Figura 27: Distribución de los tumores primarios por estadios.	148
Figura 28: Determinación de los receptores de estrógenos.	149
Figura 29: Determinación de los receptores de progesterona.	150
Figura 30: Índice de proliferación Ki67.	151

Figura 31: Relación entre la afectación ganglionar y la variable genética RT-PCR para MG.	160
Figura 32: Relación entre la afectación ganglionar y la variable genética RT-PCR para CK19.	160
Figura 33: Relación entre la afectación ganglionar y la variable genética RT-PCR para MG y/o CK19.	161
Figura 34: Relación entre el grado tumoral y la variable genética RT-PCR para MG.	162
Figura 35: Relación entre el grado tumoral y la variable genética RT-PCR para MG y/o CK19.	163
Figura 36: Relación entre la presencia de receptores de estrógenos en el tumor primario y la variable genética RT-PCR para CK19.	165
Figura 37: Relación entre la presencia de receptores de estrógenos el tumor primario y la variable genética RT-PCR para MG y/o CK19.	165
Figura 38: Relación entre el índice de proliferación Ki67 en el tumor primario y la variable genética RT-PCR para MG y/o CK19.	167
Figura 39: Relación entre el resultado de la tinción con Hematoxilina-Eosina y la variable genética RT-PCR para MG.	169
Figura 40: Relación entre el resultado de la tinción con Hematoxilina-Eosina y la variable genética RT-PCR para CK19.	170
Figura 41: Relación entre el resultado de la tinción con Hematoxilina-Eosina y la variable genética RT-PCR para MG y/o CK19.	170

Figura 42: Relación entre el resultado de la Inmunohistoquímica (IHQ) y la variable genética RT-PCR para MG.	171
Figura 43: Relación entre el resultado de la Inmunohistoquímica (IHQ) y la variable genética RT-PCR para CK19.	172
Figura 44: Relación entre el resultado de la Inmunohistoquímica (IHQ) y la variable genética RT-PCR para MG y/o CK19.	172
Figura 45: Relación con la variable genética RT-PCR para CK19 en el grupo de pacientes con 2 GC.	175
Figura 46: Relación entre el tamaño de las metástasis ganglionares y la variable genética RT-PCR para MG.	176
Figura 47: Relación entre el tamaño de las metástasis ganglionares y la variable genética RT-PCR para CK19.	177
Figura 48: Relación entre el tamaño de las metástasis ganglionares y la variable genética RT-PCR para MG y/o CK19.	177
Figura 49: Relación entre las pacientes a las que se les realizó o no linfadenectomía y la variable genética RT-PCR para MG.	178
Figura 50: Relación entre las pacientes a las que se les realizó o no linfadenectomía y la variable genética RT-PCR para CK19.	179
Figura 51: Relación entre las pacientes a las que se les realizó o no linfadenectomía y la variable genética RT-PCR para MG y/o CK19.	179
Figura 52: Relación entre el número de ganglios extraídos en la linfadenectomía y la variable genética RT-PCR para MG.	180
Figura 53: Relación entre el número de ganglios extraídos en la linfadenectomía y la variable genética RT-PCR para CK19.	181

Figura 54: Relación entre el número de ganglios extraídos en la linfadenectomía y la variable genética RT- PCR para MG y/o CK19.	181
Figura 55: Relación entre el estadio del tumor primario y la variable genética RT- PCR para MG.	183
Figura 56: Relación entre el estadio del tumor primario y la variable genética RT- PCR para CK19.	184
Figura 57: Relación entre el estadio del tumor primario y la variable genética RT-PCR para MG y/o CK19.	184
Figura 58: Curva de la supervivencia global acumulada de las pacientes con cáncer de mama.	189
Figura 59: Curva de supervivencia global acumulada de las pacientes según los receptores de estrógenos.	193
Figura 60: Curva de supervivencia global acumulada de las pacientes según el índice de proliferación Ki67.	194
Figura 61: Curva de supervivencia global acumulada de las pacientes según sus antecedentes personales de patología benigna.	197
Figura 62: Curva de la supervivencia libre de enfermedad acumulada de las pacientes con cáncer de mama.	201
Figura 63: Curva de la supervivencia libre de enfermedad acumulada de las pacientes según el grado del tumor primario.	203
Figura 64: Curva de la supervivencia libre de enfermedad acumulada de las pacientes según el tipo histológico del tumor primario.	204
Figura 65: Curva de la supervivencia libre de enfermedad acumulada de las pacientes según la variable receptores de estrógenos.	206

Figura 66: Curva de la supervivencia libre de enfermedad acumulada de las pacientes según el índice de proliferación Ki67.	207
Figura 67: Curva de la supervivencia libre de enfermedad acumulada de las pacientes según sus antecedentes personales de enfermedad tumoral.	210

ÍNDICE DE TABLAS	Página
Tabla I: Número estimado (miles) de casos, muertes y prevalencia a los 5 años, de cáncer de mama.	6
Tabla II: Tasa de incidencia de cáncer de mama estandarizada por edad en la Unión Europea para 2012. Casos por 100.000 mujeres-año. Población estándar europea.	9
Tabla III: Incidencia anual de cáncer de mama en mujeres en los registros españoles.	11
Tabla IV: Contraindicaciones absolutas para la mastectomía	39
Tabla V: Estadios en cáncer de mama definidos en base a la clasificación TNM. AJCC (American Joint Committee on Cancer) Cancer Staging Manual. 7th edition. New York, NY :Springer; 2010.	47
Tabla VI: Categorías diagnósticas del sistema BI-RADS.	66
Tabla VII: Clasificación de expresión de HER2-neu.	91
Tabla VIII: Pacientes excluidas de la población inicial y tamaño muestral definitivo del estudio.	116
Tabla IX: Criterios de inclusión de pacientes con cáncer de mama según protocolo del HCSC.	117
Tabla X: variables clínicas consideradas en el estudio de la historia clínica de las pacientes.	120
Tabla XI: Cebadores empleados en la RT-PCR convencional para la CK19.	124

Tabla XII: Cebadores empleados en la RT-PCR convencional para la MG.	124
Tabla XIII: Mezcla de la reacción para el estudio de la MG y CK19, mediante el OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN). Cebador S: Cebador Sentido. Cebador AS: Cebador Antisentido.	124
Tabla XIV: Ciclos del programa del termociclador para la amplificación del ARN de la CK19 y MG.	125
Tabla XV: Estudio descriptivo. Antecedentes genésicos, antecedentes familiares de cáncer y personales de patologías mamarias benignas.	140
Tabla XVI: Relación entre los resultados sobre MG obtenidos mediante RT-PCR convencional y RT-PCR a tiempo real.	153
Tabla XVII: Relación entre los resultados sobre CK19 obtenidos mediante RT-PCR convencional y RT-PCR a tiempo real.	153
Tabla XVIII: Relación entre los resultados sobre la combinación de MG y/o CK19 obtenidos mediante RT-PCR convencional y RT-PCR a tiempo real.	153
Tabla XIX: Valoración de la sensibilidad, especificidad, el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo de la técnica RT-PCR para la detección de micrometástasis en ganglio centinela, en comparación con la técnica de Hematoxilina y Eosina.	155
Tabla XX: Valoración de la sensibilidad, especificidad, el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo de la técnica RT-PCR para la detección de micrometástasis en ganglio centinela, en comparación con la técnica de Inmunohistoquímica.	157

Tabla XXI: Relación entre la RT-PCR de los marcadores MG y CK19 y los factores pronóstico clásicos.	164
Tabla XXII: Relación entre la RT-PCR de los marcadores MG y CK19 y los factores pronóstico biológicos.	168
Tabla XXIII: Relación entre la expresión de los marcadores MG y CK19 y otros factores estudiados.	185
Tabla XXIV: Resultados obtenidos por la técnica de RT-PCR convencional para la determinación de los marcadores genéticos MG, CK19 y los dos en conjunto.	186
Tabla XXV: Relación entre MG y CK19 determinadas con RT-PCR convencional	187
Tabla XXVI: Análisis univariable de la supervivencia global en relación con la técnica de biología molecular empleada: RT-PCR convencional.	190
Tabla XXVII: Análisis univariable de la supervivencia global en relación con los factores pronóstico clásicos.	191
Tabla XXVIII: Análisis univariable de la supervivencia global en relación con los factores pronóstico biológicos.	195
Tabla XXIX: Análisis univariable de la supervivencia global en relación con otros factores estudiados.	198
Tabla XXX: Análisis univariable de la supervivencia libre de enfermedad en relación con la técnica de biología molecular empleada: RT-PCR convencional.	202

Tabla XXXI: Análisis univariable de la supervivencia libre de enfermedad en relación con los factores pronóstico clásicos.	205
Tabla XXXII: Análisis univariable de la supervivencia libre de enfermedad en relación con los factores pronóstico biológicos.	208
Tabla XXXIII: Análisis univariable de la supervivencia libre de enfermedad en relación con otros factores estudiados.	212

ABREVIATURAS

μl	Micro Litro.
μM	Micro Molar.
a.C.	Antes de Cristo.
ACR	American College of Radiology.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ADNc	ADN copia.
AECC	Asociación Española Contra el Cáncer.
AJCC	American Joint Committee on Cancer.
ARN	Ácido ribonucleico.
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero.
ASCO	American Society of Clinical Oncology.
BAG	Biopsia con aguja gruesa.
BAV	Biopsia asistida por vacío.
BGC	Biopsia del ganglio centinela.
BRCA1	Breast Cancer 1, gen del cáncer de mama 1.
BRCA2	Breast Cancer 2, gen del cáncer de mama 2.
BSGC	Biopsia selectiva del ganglio centinela.
BGC	Biopsia del ganglio centinela
CAP	Colegio americano de patólogos.
CAT.D	Catepsina D.
CEA	Antígeno carcinoembrionario.
CISH	Hibridación in situ cromogénica.
CK	Citoqueratina.
CK19	Citoqueratina 19.
cm	Centímetros.
cols	Colaboradores.
Ct	Ciclo umbral (Threshold Cycle).
CTA	Célula tumoral aislada.
DE	Desviación estándar.
del	Delección.

dNTPs	Dinucleótidos trifosfato.
EE	Error estándar.
EGFR	Receptor del Factor de Crecimiento Epitelial.
ELISA	Inmunoanálisis ligado a enzimas.
EMA	Antígeno epitelial de membrana.
EtBr	Bromuro de etidio.
FDA	Food and Drug Administration.
FIs	Filamentos intermedios.
FISH	Hibridación fluorescente in situ.
G	Fase de crecimiento del ciclo celular.
G0	Fase 0 del ciclo celular.
G1	Fase 1 del ciclo celular.
G2	Fase 2 del ciclo celular.
GC	Ganglio Centinela.
GEICAM	Grupo Español de Investigación en Cáncer de Mama.
H&E	Hematoxilina-Eosina.
HCSC	Hospital Clínico San Carlos de Madrid.
h-MAM	Mamoglobina humana.
HR	Hazard ratio.
IARC	Agencia Internacional de Investigación del cáncer.
IC	Intervalo de Confianza.
IC	Intervalos de confianza.
IEE	Incidencia estandarizada por edad.
IHQ	Inmunoquímica.
IMT	Índice de Marcaje con Timidina.
H&E	Hematoxilina-Eosina.
ins	Inserción.
KD	Kilodalton.
kDa	Kilodalton.
LFD	Linfadenectomía
M	Fase del ciclo celular.
M	Molar.

mg	Mili gramos.
MGA	Mamaglobina A.
mm	Milímetros.
mM	Mili Molar.
mm	Milímetros.
MUC1	Mucina 1.
NK	Natural Killer.
°C	Grados centígrados.
OR	Odds Ratio.
PAAF	Punción aspiración con aguja fina.
pb	Pares de bases.
PBGD	Porfobilinógeno desaminasa.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PET-TAC	Tomografía por emisión de positrones.
RA	Riesgo acumulado.
RE	Receptores de estrógeno.
RH	Receptores hormonales.
RP	Receptores de progesterona.
RR	Riesgo Relativo.
RT	Transcripción reversa.
RTK	Receptores tirosín-quinasa.
RT-PCR	Reacción Transcriptasa-Polimerasa en Cadena a tiempo real.
SCGB	Grupo de proteínas pequeñas de secreción.
SG	Supervivencia global.
SLE	Supervivencia libre de enfermedad.
SPECT-TAC	Tomografía computarizada de emisión monofotónica.
Tc99	Tecnecio 99.
TGF- β	Factor de crecimiento tumoral.
THS	Terapia Hormonal Sustitutiva.
UICC	Union for International Cancer Control.
V	Voltios.
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular.

RESUMEN

"DETECCIÓN MOLECULAR DE MICROMETÁSTASIS EN GANGLIO CENTINELA. VALOR PRONÓSTICO."

El cáncer de mama es el segundo cáncer más frecuente en el mundo y el tumor maligno más frecuente entre las mujeres. Cambios en las células tumorales junto con el microambiente tumoral facilitan el desprendimiento de células tumorales de la masa primaria del tumor. Cualquier nodo que reciba directamente el drenaje linfático del tumor primario será el ganglio centinela GC, que se convierte en el primer nodo involucrado en el proceso de metastatización de un tumor vía sistema linfático.

Durante años las pacientes han sido sometidas a la disección axilar de la cadena ganglionar completa para evitar que estas células se diseminaran al resto del organismo, pero a la vez, esta intervención provoca una importante morbilidad.

La técnica de la biopsia del ganglio centinela (BGC) surge de la idea de que la diseminación de células tumorales a través de los ganglios linfáticos se produce de manera ordenada, de modo que la ausencia de células tumorales metastásicas en el GC predice, de forma precisa, la ausencia de metástasis en los nodos axilares restantes..

Los GC extraídos se analizan por medio de tinción con hematoxilina-eosina (H&E) y por tinción inmunohistoquímica (IHQ). Se ha demostrado que con estas técnicas se produce un número importante de falsos negativos, quedando metástasis ocultas sin identificar.

En la última década se están desarrollando técnicas de biología molecular enfocadas a la detección molecular de micrometástasis en GC, como la reacción en cadena de la polimerasa-retro transcriptasa (RT-PCR). Esta tecnología detecta

marcadores expresados en célula tumoral, que no se expresan, o lo hace en baja proporción, en tejido sano.

Los marcadores empleados en este estudio fueron mamaglobina (MG) y citoqueratina 19 (CK19), que se han revelado como los que más especificidad y sensibilidad aportan a esta tecnología.

La MG se codifica en una región está frecuentemente amplificada en neoplasias de mama. Esta proteína se expresa de forma restringida en tejido mamario y se relaciona con la proliferación de la glándula mamaria y la diferenciación terminal. Además, raramente se encuentra en tejido tumoral no mamario, por lo que se considera un marcador específico para cáncer de mama.

La CK19 es una proteína filamentosa intermedia responsable de la integridad estructural de las células epiteliales. Cuando un epitelio comienza una transformación maligna su perfil de queratinas normalmente se mantiene constante. Teniendo en cuenta que la expresión de queratina varía de forma importante de unos epitelios a otros, esta expresión se viene utilizando ampliamente para determinar la huella genética de varios carcinomas.

Existen datos que confirman que utilizando la combinación de los dos marcadores empleados en nuestro estudio: CK19 y MG, se alcanza un mayor porcentaje de sensibilidad (90%) al mismo nivel de especificidad (94%).

El objetivo de este estudio fue determinar la frecuencia de la MG y la CK19 mediante RT-PCR en el GC y valorar la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de la técnica. Se estudió también la relación entre

los marcadores y los factores pronóstico del cáncer de mama con el fin de analizar su efecto en el pronóstico de las pacientes.

Pacientes y método

Se incluyeron en el estudio 302 pacientes diagnosticadas de cáncer de mama en estadios iniciales (tamaño del tumor primario ≤ 3 cm) y sin afectación axilar tras la exploración clínica y ecográfica de la axila. Todas las pacientes eran de sexo femenino y no habían recibido terapia neoadyuvante. Durante la intervención de la BGC se tomo una muestra de cada GC extraído, para realizar el análisis de expresión de MG y CK19. Este análisis se llevó a cabo mediante RT-PCR convencional en las 302 pacientes. En 65 pacientes, el análisis se realizó además mediante la técnica de RT-PCR a tiempo real.

Resultados

Mediante la técnica de RT-PCR convencional, la frecuencia de expresión de la MG fue del 16,5%, de la CK19 fue del 12,6%, y la frecuencia de la combinación de los marcadores fue del 18,5%.

Aplicando la RT-PCR a tiempo real, la frecuencia de la MG fue del 13,8%, de la CK19 fue del 15,4% y la frecuencia de MG y CK19 en conjunto fue del 15,4% también.

Se realizó la comparación de los resultados obtenidos por cada técnica, encontrando una correlación entre resultados casi exacta ($Kappa=0,943$; $p<0.001$). Por este motivo, el resto de los análisis se realizaron con los resultados obtenidos por RT-PCR convencional de las 302 pacientes.

Se estudiaron las relaciones entre los resultados de los marcadores y los factores pronóstico del cáncer de mama, encontrando relaciones estadísticamente significativas

con el grado tumoral, la presencia de receptores de estrógenos (RE), el porcentaje de expresión del Ki67, el número de GC encontrados, el tamaño de las metástasis ganglionares, la realización o no de linfadenectomía (LFD), el número de ganglios extraídos y el estadio del tumor primario. Presentaron valor pronóstico independiente tanto en la SG, como en la SLE, la presencia de receptores de estrógenos y la presencia de antecedentes personales de patología mamaria benigna.

Conclusiones

1. El análisis de MG y CK19 por RT-PCR convencional y por RT-PCR a tiempo real muestra una fiabilidad entre métodos excelente, a través del índice kappa, pudiendo equiparar los resultados obtenidos por ambas tecnologías.
2. En pacientes con cáncer de mama en estadios tempranos la presencia de expresión de MG y CK19 es mayor en tumores primarios de grado III, frente a pacientes con tumores primarios de grado I y II.
3. En los ganglios cuyo tumor primario presenta un índice de proliferación celular $Ki67 \geq 51\%$, la expresión de MG y CK19 es mayor que la alcanzada con porcentajes de Ki67 menores al 50%.
4. Existe un 93,8% de probabilidad de no encontrar expresión de MG y CK19 en los ganglios diagnosticados como negativos por medio de tinción inmunohistoquímica.

5. Las pacientes en las que se detectaron 2 ganglios centinela, presentaron un 91,5% de ausencia de expresión de CK19, frente a un 8,5% de presencia de expresión de este marcador.
6. La expresión de MG y CK19 se asocia con mayores tamaños de las metástasis ganglionares.
7. En los ganglios en los que se detectan células tumorales aisladas existe siempre expresión de MG y CK19.
8. En las pacientes en las que no se realizó linfadenectomía se detectó un 91,8% de ausencia de expresión de MG y CK19, frente al 8,2% que sí expresaron estos marcadores tumorales.
9. La expresión de MG y CK19 se asocia con un mayor número de ganglios a extraer en la linfadenectomía.
10. Resultaron ser factor pronóstico independiente con respecto a la SG, los antecedentes personales de patologías benignas y la presencia de receptores de estrógenos.
11. El índice de proliferación celular Ki67 en porcentajes mayores o iguales al 51% es un factor de mal pronóstico con respecto a la SG y a la SLE.

12. Se observa un 67,9% de reducción del riesgo de fallecer en las pacientes con presencia de receptores de estrógenos, frente a las pacientes con ausencia de ellos.

13. Se observa un 55% de reducción del riesgo de recidivar en las pacientes con presencia de receptores de estrógenos, frente a las pacientes con ausencia de ellos.

14. Los antecedentes personales de patologías benignas constituyen una variable con valor pronóstico independiente en el riesgo de recidivar de las pacientes.

SUMMARY

"MOLECULAR DETECTION OF MICROMETASTASES IN SENTINEL LYMPH NODE. PROGNOSTIC VALUE"

Breast cancer is the second most frequent cancer worldwide, and the most frequent among women. Specific molecular changes occurring within the tumor cells and tumor microenvironment contribute to the detachment of tumor cells from the primary tumor mass. Any lymph node receiving direct lymphatic drainage from the primary tumor is the sentinel lymph node (SLN), becoming the first node involved when a tumor metastatizes via lymphatics.

To avoid tumor cells dissemination, axillary lymph node dissection (ALND) has been used for many years, although the procedure carries important morbidity.

Sentinel lymph node biopsy (SLNB) arises from the idea that lymphatic metastases occur in an orderly manner, thus the absence of metastatic tumor cells in the SLN accurately predicts the absence of metastases in the remaining axillary nodes.

Resected SLN are stained with hematoxylin and eosin (H&E) and with immunohistochemistry (IHC). It has been stated that these procedures give place to an important number of false negative results, remaining occult metastases undetected.

In the last decade molecular biology techniques have been developed focused on the molecular detection of micrometastases in SLN, like the retro transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). This technology detects the expression of tumor markers in tumor cells, that are not expressed, or they do in low proportion, in healthy tissue.

Markers used in this study were Mammaglobin (MG) and Cytokeratin 19 (CK19). They have been reported as the most sensitivity and specificity conferring to this technology.

The region in which MG is codified is frequently amplified in breast neoplasms. Its expression is only seen in mammary tissue and it is related to mammary gland proliferation and terminal differentiation. Indeed it is rarely found in non mammary tumor tissue. Thus MG is considered as a specific marker of breast cancer.

CK19 is an intermediate filaments containing protein which is responsible of the cell structural integrity. The keratins profile of a tissue remains constant even through malignant transformation. Knowing that keratin expression varies from one epithelium to another, this expression is already being used for cancer identification purposes.

Several data confirm that higher percentages of sensitivity (90%) and specificity (94%) can be reached by utilizing the combination of both markers used in our study: MG and CK19.

The objective of this study was to determine the frequency of MG and CK19 by means of RT-PCR in SLN and to assess the sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of this technology. The relation between marker expression and breast cancer prognostic factors was analyzed to obtain the prognostic effect on patient's outcome.

Patients and method

A prospective series of 302 clinically node negative early stage breast cancer patients (primary tumor ≤ 3 cm) was evaluated. All the patients were women and none of

them had received neoadjuvant therapy. During the SLNB a sample was taken from each SLN to analyze MG and CK19 expression. This was assessed by means of RT-PCR in the 302 patients. In 62 patients, real time RT-PCR was also performed.

Results

By means of conventional RT-PCR, frequencies of markers were: MG 16,5%, CK19 12,6% and Mg and CK19 together 18,5%.

When real time RT-PCR was performed, frequencies of markers were: MG 13,8%, CK19 15,4% and both MG and CK19 15,4%.

The comparison of the results obtained by each technique was analyzed, finding a nearly exact correlation between results ($Kappa=0,943$; $p<0.001$). Thereafter all statistical analyses were performed on the results obtained by conventional RT-PCR, corresponding to the 302 enrolled patients.

The expression of MG and CK19 in relation to the cancer prognostic factors was analyzed. Statistically significant differences were found regarding the primary tumor grade, the presence of estrogen receptors (ER), the percentage of expression of Ki67, the number of SLN found, the size of the metastases in SLN, whether ALND was performed or not, the number of non sentinel lymph nodes (NSLN) dissected, and primary tumor stage. The presence of ER and the presence of previous benign mammary pathology were identified as independent prognostic factors of OS and DFS.

Conclusions

1. The analysis of MG and CK19 expression by means of conventional RT-PCR and real time RT-PCR shows an excellent reliability between methods (Kappa index), making it possible to compare the results obtained by both technologies.
2. In early stages breast cancer patients, the presence of MG and CK19 expression is higher in grade III primary tumors, against grade I and II primary tumors.
3. In lymph nodes with primary tumors presenting a percentage of Ki67 proliferation marker $>51\%$, MG and CK19 expression reaches the 28,9%, being this expression greater than those reached with Ki67 percentages $<50\%$.
4. There is a 93,8% probability of not finding MG and CK19 expression in lymph nodes that have been classified as negative by immunohistochemistry.
5. Patients in which 2 sentinel lymph nodes were found, showed a 91,5% of CK19 absence, against an 8,5% of this marker expression presence.
6. MG and CK19 expression correlates with bigger sizes of the lymph node metastases.
7. The detection of isolated tumor cells in lymph nodes implies MG and CK19 expression in all cases.

8. In patients that had not undergone axillary lymph node dissection, a 91,8% of MG and CK19 absence was detected, against an 8,2% in which these markers were found.
9. MG and CK19 expression correlates with a greater number of lymph nodes to be excised in the axillary lymph node dissection.
10. The presence of estrogen receptors, as well as the presence of previous benign pathology, were identified as independent prognostic factors of OS and DFS.
11. A percentage of Ki67 expression over 51% is a bad prognosis factor regarding the OS and DFS.
12. A 67,9% risk reduction was found, regarding OS, in patients with estrogen receptors presence, against patients with ER absence.
13. A 55% risk reduction was found, regarding DFS, in patients with estrogen receptors presence, against patients with estrogen receptors absence.
14. The presence of previous benign pathology constitutes a variable with independent prognostic value on DFS.

INTRODUCCIÓN

I. EPIDEMIOLOGÍA

I.A. Incidencia.

El cáncer de mama es el segundo cáncer más frecuente en el mundo y el tumor maligno más frecuente entre las mujeres. Se estima que en 2012 se produjeron 1,67 millones de casos nuevos en el mundo (25% del total de casos diagnosticados de cáncer en 2012). Es el cáncer más común en mujeres tanto en las regiones más desarrolladas como en las que están en vías de desarrollo, con un número ligeramente mayor de casos en las menos desarrolladas (883.000 casos) que en las más desarrolladas (794.000 casos). (*Ferlay J, et al. 2013a*).

La tasa de incidencia se refiere al número de casos nuevos que ocurren en una población específica en un periodo de tiempo concreto. Normalmente se expresa como número de casos por 100.000 personas-año. La información sobre incidencia procede de los registros poblacionales de cáncer, los cuales cubren una zona geográfica concreta.

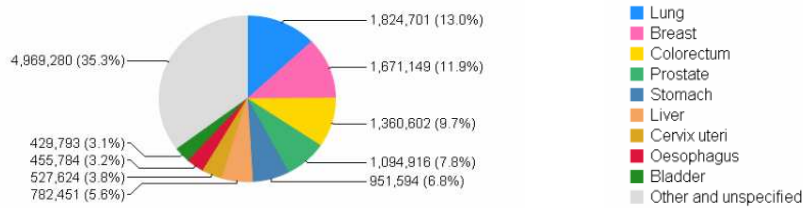
Las tasas de incidencia tienen una variación hasta de cuatro veces a lo largo de todas las regiones del mundo. Éstas varían en un rango que va desde 27 por 100.000 mujeres en África Central y Asia del Este hasta 96 por 100.000 mujeres en Europa Occidental.

Considerando ambos sexos, el cáncer de mama es el segundo en frecuencia a nivel mundial (1,67 millones de casos; 11,9%), por detrás del cáncer de pulmón (1,82 millones de casos; 13%) y seguido del cáncer colorrectal (1,36 millones de casos; 9,7%).

El cáncer de mama ocupa el quinto puesto como causa de muerte (521.907 muertes; 6,4%), precedido por el cáncer de pulmón (1.589.925 muertes; 19,4%), por el

cáncer de hígado (745.533 muertes; 9,1%), por el cáncer de estómago (723.073 muertes; 8,8%) y por el cáncer colorrectal (693.933; 8,5%). Figura 1. (Ferlay J, et al.2013a).

Incidencia



Mortalidad

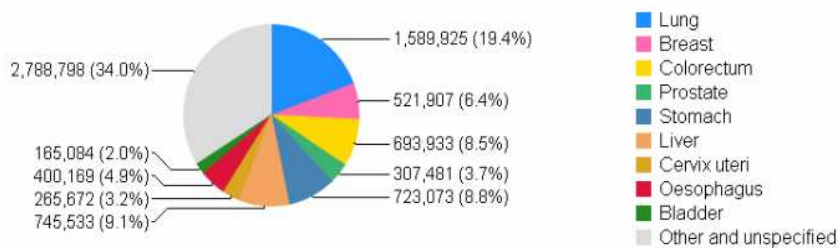


Figura 1. Valores de incidencia y mortalidad de los distintos tipos de cáncer para ambos sexos a nivel mundial.

En la figura 2 se muestra la distribución geográfica de incidencia de cáncer de mama a nivel mundial para el año 2012, a partir de la base de datos GLOBOCAN (Ferlay J, et al.2013a). Las tasas de incidencia más altas se observan en Norteamérica, Australia, Países Nórdicos, Europa Occidental y regiones de América del Sur.

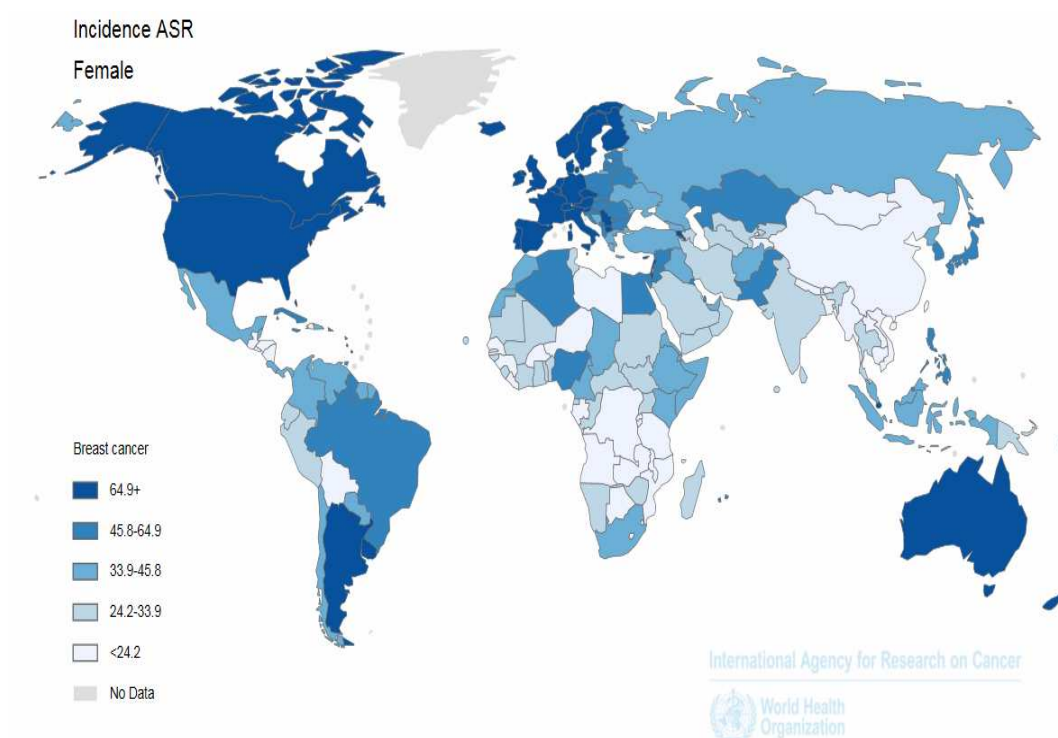


Figura 2. Tasas de incidencia de cáncer de mama estandarizadas por edad en el mundo. Casos/100.000 mujeres/año. Año 2012. Población estándar mundial. GLOBOCAN.

Más de la mitad de los casos de cáncer de mama se diagnostican en los países menos desarrollados: 883.000 casos al año. En Europa 494.000 casos y 233.000 en los Estados Unidos de América (*Ferlay J, et al.2013a*). La prevalencia más baja la tienen países como Japón, Tailandia, Nigeria e India. Las tasas de incidencia más altas se observan en Norteamérica, Australia, Países Nórdicos y Europa Occidental. Tabla I y figura 3.

Tabla I. Número estimado (miles) de casos, muertes y prevalencia a los 5 años, de cáncer de mama (Ferlay J, et al.2013a).

Número estimado (miles)	Casos	Muertes	Prev. 5 años
Mundo	1671	522	6232
Regiones más desarrolladas	788	198	3201
Regiones menos desarrolladas	883	324	3032
WHO Región de África (AFRO)	100	49	318
WHO Región de las Américas (PAHO)	408	92	1618
WHO Región del Mediterráneo Oriental (EMRO)	99	42	348
WHO Región de Europa (EURO)	494	143	1936
WHO Región de Asia Sudoriental (SEARO)	240	110	735
WHO Región del Pacífico Occidental (WPRO)	330	86	1276
IARC miembros (24 países)	935	257	3591
Estados Unidos de América	233	44	971
China	187	48	697
India	145	70	397
Unión Europea (UE-28)	362	92	1444

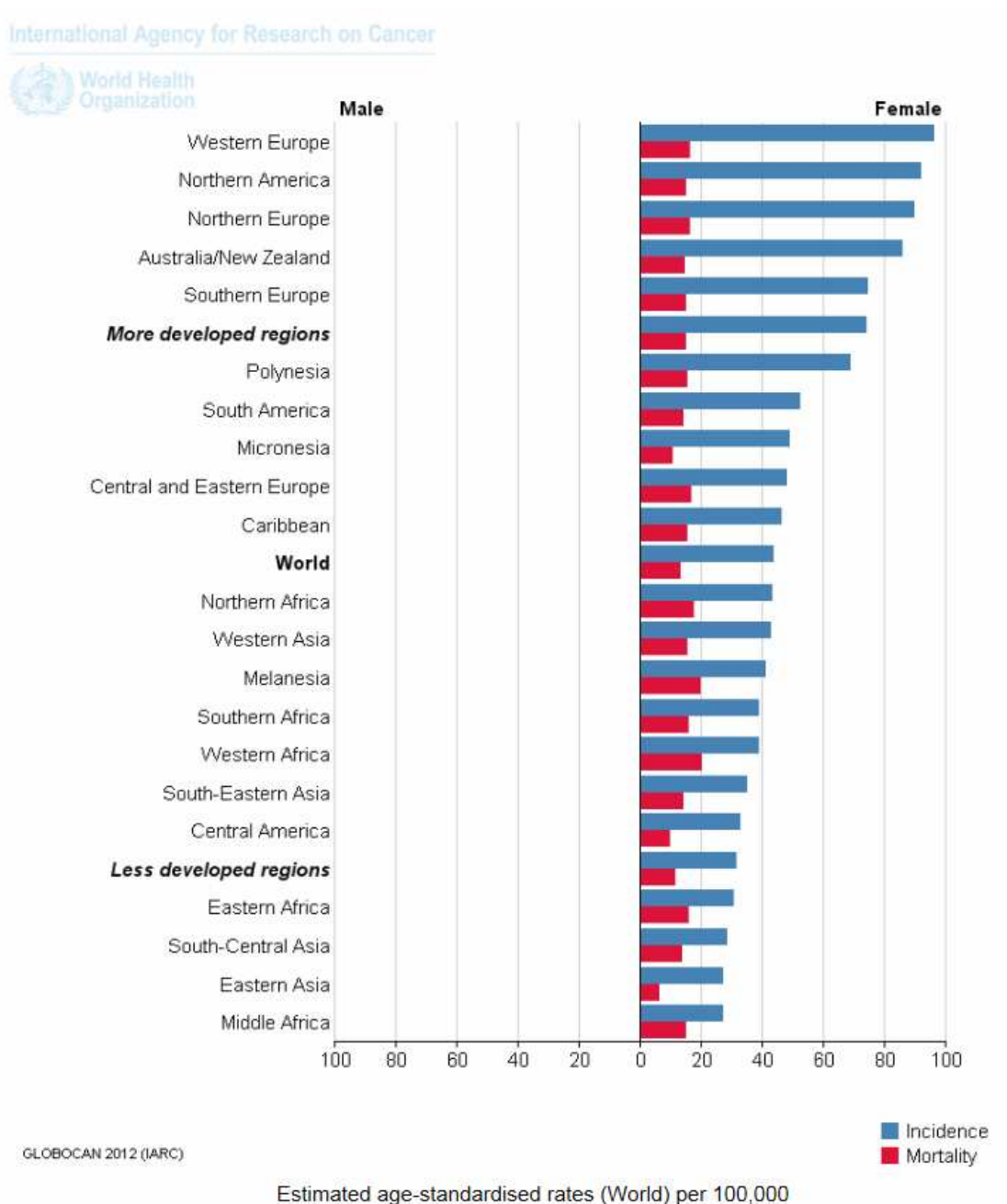


Figura 3. Tasas estimadas de incidencia y mortalidad del cáncer de mama estandarizadas por edad (mundial) por 100.000. GLOBOCAN 2012 (Ferlay J, et al.2013a).

Dentro de Europa, el cáncer de mama es el que tiene mayor incidencia en 2012. Existe una variación de tres veces en la tasa de incidencia (49 - 148 por 100.000 mujeres) con un patrón geográfico claro. En la tabla II se observan altas tasas de incidencia en la Europa Occidental: países como Bélgica (147), Francia (137) y los Países Bajos (131); así como en la Europa del Norte, países como el Reino Unido (129) y países nórdicos como Dinamarca (143), Islandia (131) y Finlandia (121). En comparación, las tasas de incidencia en los países de Europa del Este son mucho más bajas, como en Ucrania (54) y Moldavia (53) (*Ferlay J, et al.2013b*).

Tabla II. Tasa de incidencia de cáncer de mama estandarizada por edad en la Unión Europea para 2012. Casos por 100.000 mujeres-año. Población estándar europea (*Ferlay J, et al.2013b*).

	Tasa ajustada
Europa	92.4
EU-27	108.8
Europa Central y del Este	63.4
Bielorrusia	60.5
Bulgaria	76.3
República Checa	95.5
Hungría	72.3
Moldavia	52.9
Polonia	69.9
Rumanía	66.2
Federación Rusa	60.7
Eslovaquia	78.1
Ucrania	54.0
Europa del Norte	120.8
Dinamarca	142.8
Estonia	69.0
Finlandia	121.0
Islandia	130.7
Irlanda	122.4
Letonia	69.8
Lituania	65.2
Noruega	98.4
Suecia	108.2
Reino Unido	129.2
Europa del Sur	96.8
Albania	69.4
Bosnia Herzegovina	49.1
Croacia	83.0
Chipre	104.3
Grecia	58.6
Italia	118.0
FYR Macedonia	101.4
Malta	116.2
Montenegro	75.9
Portugal	85.6
Serbia	92.3
Eslovenia	88.4
España	84.9
Europa Occidental	126.8
Austria	90.7
Bélgica	147.5
Francia	136.6
Alemania	122.0
Luxemburgo	118.2
Los Países Bajos	131.3
Suiza	111.3

En España se diagnostican unos 25.000 casos al año, lo que representa casi el 30% de todos los tumores del sexo femenino en nuestro país (*Ferlay J, et al.2013a*). La mayoría de los casos se diagnostican entre los 35 y los 80 años, con un máximo entre los 45 y los 65 años. A pesar de que no se dispone de un sistema nacional de registro de tumores para conocer las cifras exactas, sí se puede recurrir a los registros españoles de las distintas comunidades autónomas. En la tabla III se presenta la incidencia de cáncer de mama proporcionada por los registros españoles incluidos en la última publicación *Cancer Incidence in Five Continents* de la Agencia Internacional de Investigación del cáncer (IARC) (*Parkin DM, et al.2014*). Se presenta también el cálculo del riesgo acumulado, el cual representa la probabilidad de desarrollar cáncer de mama de una mujer desde que nace hasta que cumple 74 años si estuviese sujeta a las tasas de incidencia específicas por edad observadas en este momento y suponiendo que no muera antes por otras causas. La mayor incidencia de cáncer de mama se registra en País Vasco, Asturias, Murcia y Canarias, mientras que las tasas más bajas correspondieron a los registros de Cuenca, La Rioja y Albacete.

Tabla III. Incidencia anual de cáncer de mama en mujeres en los registros españoles (*Parkin DM, et al. 2014*).

Cáncer de mama en España. Incidencia estandarizada por edad (IEE) (por 100.000) y riesgo acumulado (RA) (%) (0-74). Tasas y errores estándar (EE).										
	Hombres					Mujeres				
	Casos	IEE	EE	RA	EE	Casos	IEE	EE	RA	EE
Albacete	11	0.6	0.19	0.05	0.02	846	57.6	2.16	6.27	0.25
Asturias	49	1.0	0.15	0.12	0.02	3091	57.7	1.17	6.27	0.13
País Vasco	83	0.8	0.10	0.11	0.01	6063	64.4	0.89	6.88	0.10
Islas Canarias	21	0.5	0.11	0.06	0.01	2799	58.8	1.16	6.57	0.14
Ciudad Real	11	0.5	0.17	0.06	0.03	850	51.6	1.97	5.67	0.23
Cuenca	10	1.1	0.39	0.13	0.05	447	50.6	2.78	5.39	0.30
Girona	17	0.6	0.15	0.06	0.02	1791	67.8	1.75	7.49	0.21
Granada	21	0.7	0.17	0.08	0.02	1753	54.8	1.39	5.92	0.16
La Rioja	7	0.5	0.22	0.06	0.03	817	65.9	2.54	6.99	0.29
Mallorca	18	0.6	0.14	0.05	0.02	1801	59.7	1.51	6.48	0.18
Murcia	33	0.7	0.13	0.09	0.02	2827	59.6	1.19	6.57	0.14
Navarra	30	1.0	0.20	0.09	0.02	1659	69.6	1.86	7.47	0.21
Tarragona	23	0.8	0.17	0.11	0.03	1872	68.8	1.71	7.50	0.20

Tasa estandarizada por edad (población estándar europea) en casos/100.000 mujeres-año. Riesgo acumulado 0-74 años en %.

Tanto el número de casos como las tasas de incidencia aumentan lentamente en España y en el mundo, probablemente debido al envejecimiento de la población y a un diagnóstico cada vez más precoz. También hay que mencionar como posibles causas de este incremento los cambios en los patrones reproductivos y en los hábitos de vida y la introducción de la terapia hormonal sustitutiva (*Pollán M, et al. 2007*). El aumento de la incidencia se estima en un 1-2% anual y es constante desde 1960 en Estados Unidos.

Se estima que el riesgo de padecer cáncer de mama es, aproximadamente, 1 de cada 8 mujeres.

En España existe una distribución geográfica de incidencia notablemente variable según las provincias. Así en Cataluña la tasa de incidencia es de 83,9

casos/100.000 habitantes, mientras que la media nacional se sitúa en 50,9 casos/100,000 habitantes (*Asociación Española Contra el Cáncer*).

I.B. Mortalidad.

La tasa de mortalidad es el número de muertes ocurridas por 100.000 mujeres-año. En España la información sobre mortalidad procede de los certificados de defunción y es recogida por los registros civiles. El cáncer de mama es, por tanto, una causa de muerte bien documentada. Sin embargo la mortalidad no refleja adecuadamente la frecuencia de este tumor, ya que 4 de cada 5 mujeres siguen vivas cinco años después del diagnóstico.

Las últimas cifras para todo el mundo se refieren al año 2012, en el que murieron por cáncer de mama 521.907 mujeres (*Ferlay J, et al.2013a*). En Europa, un total de 131.200 mujeres murieron por esta causa (*Ferlay J, et al.2013b*), y en España la cifra asciende a 6.075 mujeres (*Ferlay J, et al.2013a*).

El cáncer de mama se sitúa como la quinta causa de muerte por cáncer (522.000 muertes) y mientras que constituye la causa más frecuente de muerte por cáncer en las mujeres en regiones menos desarrolladas (324.000 muertes; 14,3% del total), actualmente constituye la segunda causa de muerte por cáncer en las regiones más desarrolladas (198.000 muertes; 15,4%) por detrás del cáncer de pulmón. El rango en tasas de mortalidad entre las regiones del mundo es menor que el rango para las tasas de incidencia. Esto se debe a una mejor supervivencia al cáncer de mama en regiones desarrolladas, con tasas que van desde 6 por 100.000 mujeres en Asia del Este a 20 por 100.000 mujeres en África Occidental. En la figura 4 se muestra la distribución

geográfica mundial para las tasas de mortalidad para el año 2012, a partir de la base de datos GLOBOCAN (Ferlay J, et al.2013a).

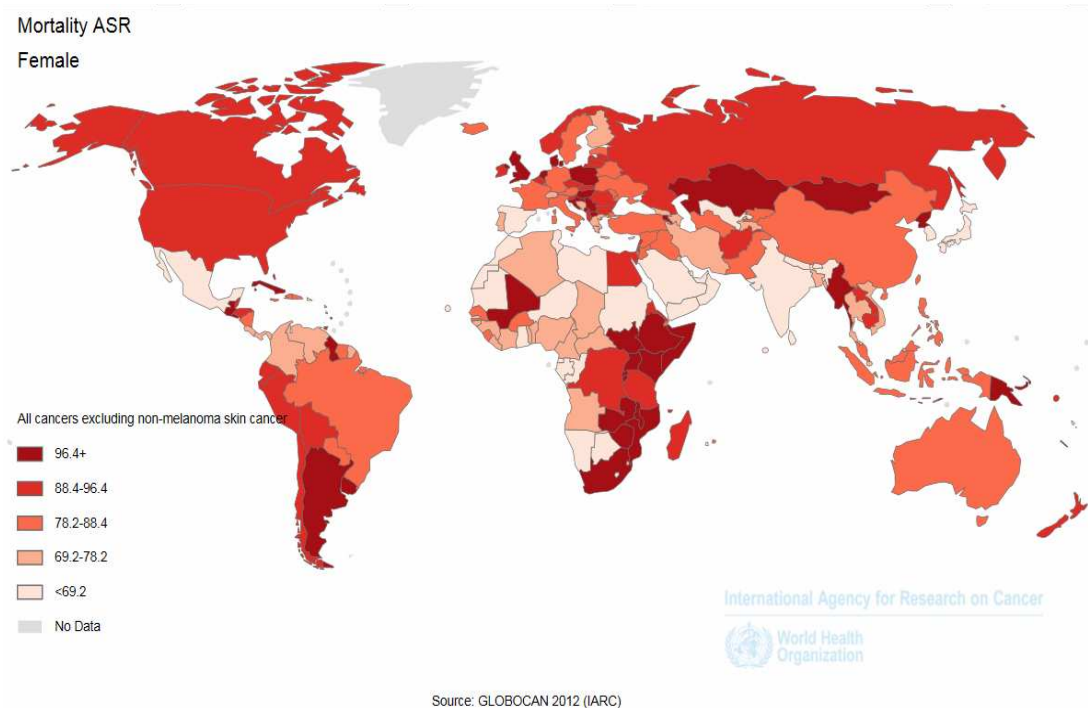


Figura 4. Tasas de mortalidad de cáncer de mama estandarizadas por edad en el mundo. Casos/100.000 mujeres/año. Año 2012. Población estándar mundial. GLOBOCAN.

En la mayor parte de los países desarrollados, la mortalidad por cáncer de mama sufrió un importante aumento desde los años 50 hasta la década de los 80 (Botha JL, et al. 2003). En los años 90, esta tendencia se invierte debido al éxito de los nuevos tratamientos y al efecto de los programas de cribado sobre la mortalidad (Botha JL, et al. 2003) (Parkin DM, et al. 2006). Este cambio de tendencia se produce en España en 1993. Desde 1975 a 1985 la mortalidad por esta causa crecía un 2% anual. Esta tendencia creciente fue incluso más pronunciada en el periodo 1985-1988 (incremento

anual del 4%), estabilizándose posteriormente. A partir de 1993 la mortalidad por cáncer de mama decae un 2,4% cada año (*Pollán M, et al. 2007*).

En Europa, el rango varía dos veces en cuanto a tasa de mortalidad (15 - 36 por 100.000). Las tasas de mortalidad fueron más altas en el Norte (por ejemplo Bélgica: 29 y Dinamarca: 28) y en el Sur (como Serbia: 31 y Macedonia: 36). Las altas tasas de mortalidad en los países del norte son un reflejo de la gran incidencia, mientras que en el Sur hay una elevada tasa de mortalidad a pesar de la no tan elevada incidencia, lo cual se debe a una peor supervivencia (*Ferlay J, et al.2013b*).

En España, en el año 2012 se produjeron más de 6.000 defunciones en mujeres por cáncer de mama.

La supervivencia global a los cinco años de las pacientes afectadas de cáncer de mama es de un 78%. El cáncer de mama constituye la principal causa de muerte por cáncer en las mujeres, siendo el 14% de los tumores malignos. En España el 16,7% de todos los fallecimientos en el sexo femenino es por dicho cáncer, siendo el 3,3% de todas las muertes en las mujeres. La figura 5 muestra la distribución de la tasa de mortalidad por 100.000 habitantes ajustada a la población europea en el año 2007, según las diferentes provincias españolas (*Pollán M, et al. 2007*).

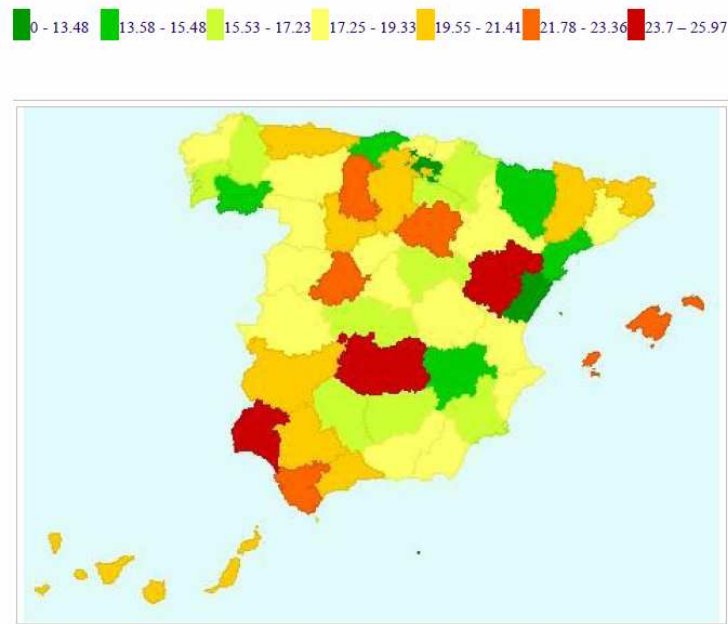


Figura 5. Tasa de mortalidad ajustada a la población europea por 100.000 habitantes del cáncer de mama en el sexo femenino en España. Año 2007. Centro Nacional de Epidemiología Instituto de Salud Carlos III.

I.C. Supervivencia.

La supervivencia se refiere al porcentaje de mujeres diagnosticadas de cáncer de mama vivas tras un determinado periodo de tiempo.

La mejor fuente de información sobre supervivencia en Europa procede de los estudios EUROCORE, que cuantifican la supervivencia observada y relativa para todos los casos incluidos en los registros poblacionales de cáncer que participan en estos estudios. En el EUROCORE-4 los datos se refieren a mujeres diagnosticadas en el periodo 2000-2002. La supervivencia global en Europa a los 5 años, en estas mujeres, fue del 79%, inferior a la observada en EEUU (90%) (Verdecchia A, et al. 2007). Dentro de Europa, la supervivencia fue significativamente mayor en los países nórdicos, Suiza, Italia, Holanda, España y Austria. En España, la supervivencia a 5 años se sitúa en un

83%, significativamente más alta que la media europea. La peor supervivencia se observa en los países del Este, Irlanda y Reino Unido. La supervivencia a 5 años ha aumentado entre 1992 y 2002 un 1,6% anual y las diferencias entre los distintos países europeos se van reduciendo (*Verdeccia A, et al. 2007*). Actualmente se dispone de los datos recopilados en el EURO CARE-5, los cuales integran información sobre pacientes diagnosticados de cáncer durante el periodo 1978 - 2008. Estos datos están dando como fruto artículos de los que se desprende una mejora de la supervivencia en Europa. De (*De Angelis R, et al. 2014*).

Otra fuente de información en nuestro país es el estudio “El Álamo”, desarrollado por el grupo GEICAM, que permite disponer de información sobre la supervivencia de las pacientes atendidas en los hospitales españoles participantes, con una representación geográfica más amplia (*Martín M, et al. 2006*). El Álamo II incluyó más de 10.000 mujeres españolas diagnosticadas de cáncer de mama en hospitales españoles entre 1994 y 1997. La supervivencia observada a los 5 años fue superior al 80%. Una comparación entre los estudios Álamo I (mujeres diagnosticadas en 1990-1993) y Álamo II (diagnosticadas en 1994-1997) muestra un aumento estadísticamente significativo de la supervivencia en el segundo estudio (83% a los 5 años) respecto al primero (75%), debido en parte al incremento de casos diagnosticados en estadio I, pero también a mejoras terapéuticas (*Martín M, et al. 2006*). En cuanto al proyecto El Álamo III, se realiza una encuesta de evolución de pacientes con cáncer de mama diagnosticadas en 1998 - 2001. Se recogen datos demográficos, terapéuticos y evolutivos de 10.675 pacientes de 35 hospitales en España. En este estudio se ratifica el aumento de la supervivencia a los 5 años, aumentando en este periodo hasta el 87% (*López-Tarruella S, et al. 2001*).

II. ETIOPATOGENIA

II.A. Formas de presentación.

Atendiendo al origen existen tres tipos genéricos de cáncer de mama:

- Esporádico, sin antecedentes familiares. Este tipo constituye entre el 70 y el 80% de los casos.
- Familiar, con antecedentes familiares, pero no atribuibles a la genética. Representa entre el 15 y el 20% de los casos.
- Hereditario: atribuidos a mutaciones en línea germinal. Sólo constituyen del 5 al 10% de los casos. De estos, el 40% se debe a mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2.

II.B. Factores de riesgo.

A nivel internacional, el cáncer de mama ha aumentado más en las poblaciones con menor nivel de riesgo. El cambio en los patrones reproductivos, la introducción de la terapia hormonal sustitutiva, el incremento de la obesidad, el mayor consumo de alcohol y una vida más sedentaria son los principales responsables de las tendencias observadas (*Parkin DM, et al. 2006*). Los cambios dietéticos y el mejor estado nutricional en los países desarrollados implican además un adelanto en la menarquia y un retraso de la menopausia, lo que a su vez supone un incremento de la exposición a los estrógenos a lo largo de la vida. En nuestro país es notable el cambio en la dieta, aumentando el consumo de carne, pescado, lácteos y alimentos procesados y disminuyendo el consumo de cereales y legumbres (*Aranceta J. 2001*) (*Serra-Majem L, et al.1993*). Al mismo tiempo otro factor de riesgo importante, la obesidad, ha aumentado en nuestro país (*Regidor E, Gutiérrez-Fisac JL. 2005*).

Los factores de riesgo conocidos, incluida la herencia, explicarían menos del 50% de los casos observados (*Madigan MP, et al. 1995*), por lo que se ha sugerido la influencia de factores ambientales que ayudarían a explicar el exceso de casos en determinadas poblaciones.

A continuación se exponen una serie de factores que pueden aumentar el riesgo de desarrollar un cáncer de mama a lo largo de la vida:

II.B.1. Sexo:

Los varones presentan una incidencia de cáncer de mama 100 veces menor que las mujeres, por lo que el sexo es el factor de riesgo más importante. Las mujeres tienen una glándula mamaria más desarrollada que la de los hombres y además, las células de esta glándula están sometidas al estímulo constante de estrógenos y progesterona.

II.B.2. 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 BRCA1 o BRCA2. La frecuencia se incrementa y alcanza una meseta entre los 45 a 55 años. El riesgo de desarrollar el cáncer de mama en edades entre 80 a 85 años es el doble del de las mujeres de 60 a 65 años (<http://www.aecc.es>).

II.B.3. Factores geográficos:

Existen estudios sobre inmigrantes japoneses en Hawái que muestran que las tasas de cáncer de mama en los inmigrantes se asemeja a la tasa del país hospedador en

una o dos generaciones, lo que indica que los factores ambientales tienen más importancia que los genéticos (*Brinton LA, et al. 1996*).

II.B.4. Edad de menarquia y menopausia.

Las mujeres que comienzan su menstruación muy precozmente (antes de los 12 años), o que tienen una menopausia tardía (considerada después de los 50 años) tienen mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama. Las mujeres que presentan una menopausia natural después de los 55 años tienen el doble de probabilidades de desarrollar un cáncer de mama que las mujeres con menopausia antes de los 45 años. Hay estudios que indican que las mujeres que se someten a ooforectomía bilateral antes de los 35 años, ven reducido en un 60% el riesgo de padecer cáncer de mama, en relación a aquellas que tienen menopausia natural (*McPherson K, et al. 2000*).

II.B.5. Edad del primer embarazo.

Tanto la nuliparidad como la edad avanzada del primer embarazo, son dos circunstancias que aumentan la incidencia del cáncer de mama. El riesgo de padecer cáncer de mama en mujeres que tienen su primer embarazo a término después de los 30 años es el doble del de las mujeres que tienen su primer hijo antes de los 20 años. El grupo de mayor riesgo son aquellas mujeres que tienen el primer embarazo a término después de los 35 años. Estas mujeres parecen presentar un riesgo más elevado incluso que el de las mujeres nulíparas. Por otro lado, se ha visto que reduce el riesgo de cáncer de mama una edad temprana de segundo embarazo a término (*McPherson K, et al. 2000*).

II.B.6. Lactancia materna

No está establecido que sea un factor protector, pero de serlo, solo tendría influencia en las mujeres premenopáusicas. (*McPherson K, et al. 2000*).

II.B.7. Historia familiar.

Hasta un 10% de los casos de cáncer de mama en países occidentales se debe a una predisposición genética. La susceptibilidad de presentar un cáncer de mama generalmente se hereda de forma autosómica dominante con una penetrancia limitada. Esto significa que se puede transmitir por cualquiera de los dos sexos y que algunos miembros de la familia pueden transmitir el gen alterado sin desarrollar el cáncer por sí mismos. Aún no está bien establecido el número de genes que pueden ser responsables de la aparición de un cáncer de mama. Existen dos genes, BRCA1 y BRCA2, localizados en los brazos largos de los cromosomas 17 y 13 respectivamente, que se han identificado y asociado a una proporción importante de familias con muy alto riesgo (*DeMichele A, Webber BL. 2000*).

Ciertas mutaciones se dan con elevada frecuencia en poblaciones determinadas. Por ejemplo, el 2% de las mujeres judías Askenazi portan BRCA1 185 del AG (delección de dos pares de bases en posición 185), BRCA1 5382 ins C (inserción de un par de bases extra en posición 5382) o BRCA 6174 del T (delección de un único par de bases en posición 6174), mientras que la alteración BRCA2 999 del 5 (delección de cinco pares de bases en posición 999) está presente en el 50% de todos los casos de cáncer de mama familiar en Islandia (*Futreal PA, Liu Q, et al*).

Mutaciones heredadas en los genes p53 y PTEN se asocian con síndromes familiares (Li-Fraumeni y síndrome de Cowden respectivamente) que conllevan alto

riesgo de cáncer de mama, aunque ambas mutaciones son poco frecuentes. Estos son, casi con toda seguridad, otros de los genes (todavía sin identificar) que incrementan el riesgo de enfermedad, aunque en un grado moderado. Estos genes probablemente no generarán familias afectadas de múltiples casos de cáncer, pero sí pueden ser lo suficientemente comunes como para constituir una parte importante de la contribución genética total en el cáncer de mama (*Black DM. 1994*).

Muchas familias afectadas por cáncer de mama muestran un elevado número de casos de otros cánceres como de ovario, colon o próstata, que podrían ser atribuibles a la misma mutación heredada. Pacientes con cáncer bilateral, aquellos que desarrollan una combinación de cáncer de mama con otro cáncer de tipo epitelial, y mujeres que adquieren la enfermedad en una edad precoz, todos ellos tienen una mayor probabilidad de portar una mutación genética que les predispone a desarrollar cáncer de mama. La mayoría de los cánceres de mama debidos a una mutación genética aparecen antes de los 65 años. Aquellas mujeres que presentan historias familiares con elevado número de casos de cáncer de mama de inicio temprano y que no se han visto afectadas a los 65 años, muy probablemente no han heredado la mutación genética que sí portan sus familiares (*Hill ADK, et al. 1997*).

El riesgo de una mujer de padecer cáncer de mama es un 50% mayor si tiene un pariente de primer grado (madre, hermana o hija) que haya desarrollado la enfermedad antes de los 50 años. El riesgo aumenta cuanto menor sea la edad en el momento de desarrollar la enfermedad (*Bilimoria M, Morrow M. 1995*).

II.B.8. Antecedentes de patología mamaria benigna.

Las mujeres con hiperplasia epitelial atípica severa tienen de cuatro a cinco veces mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama que las mujeres que no presentan ningún cambio proliferativo en las mamas. Las mujeres que presentan estos cambios y además una historia familiar con cáncer de mama (parientes de primer grado) presentan un riesgo nueve veces mayor. Las mujeres que presentan quistes palpables, fibroadenomas complejos, papilomas ductales o hiperplasia epitelial tienen un riesgo de padecer cáncer de mama ligeramente mayor (1,5 - 3 veces) que las mujeres que no presentan estos cambios, no siendo este aumento clínicamente importante (*Isaacs CJD, et al. 2000*).

II.B.9. Riesgos histológicos.

En los hallazgos histológicos de displasias existe un riesgo de que estas evolucionen hacia el carcinoma in situ, especialmente en aquellas con proliferación. Las pacientes con hiperplasias sin atipia tienen un riesgo relativo (RR) de 1 a 2, mientras que en las hiperplasias con atipia el RR se incrementa de 6 a 8, dato aplicable a ambas mamas (*McPherson K, et al. 2000*).

Las pacientes que presentan carcinomas in situ, de no ser tratadas, un tercio de ellas evolucionan a carcinomas invasores en un periodo de 10 a 18 años del diagnóstico (*Isaacs CJD, et al. 2000*).

Si el carcinoma in situ es lobulillar, del 15% al 20% de los casos desarrollan el cáncer en esa mama y del 10% al 15% lo desarrollan en la mama contralateral (*Isaacs CJD, et al. 2000*).

Cuando se ha padecido cáncer de mama invasivo en una mama, el riesgo de desarrollar cáncer en la mama contralateral es de 0,5% a 1% anual, manteniéndose constante durante dos años, según publicaciones del Journal of the National Cancer Institute de Estados Unidos (*Mavaddat N, et al. 2015*).

II.B.10. Radiación.

Su efecto es directamente proporcional a la dosis e inversamente proporcional a la edad, permaneciendo de por vida. Se observa doble riesgo de padecer cáncer de mama en las adolescentes expuestas a radiación durante la Segunda Guerra Mundial. El screening mamográfico se asocia con un descenso neto en la mortalidad debida a cáncer de mama entre las mujeres de más de 50 años (*McPherson K, et al. 2000*).

II.B.11. Estilo de vida.

Dieta. Parece existir una correlación entre la incidencia de cáncer de mama y el consumo de grasas en la dieta. Sin embargo esto no se ha podido demostrar estadísticamente (*Chlebowski RT, et al. 2006*). Las dietas ricas en grasas animales están directamente asociadas con la obesidad y con niveles altos de colesterol, esto conlleva una mayor producción de estrógenos por vía suprarrenal y, por tanto, a una mayor probabilidad de aparición de neoplasia maligna (*Chlebowski RT, et al. 2006*).

Peso. La obesidad se asocia con el doble de riesgo de padecer cáncer de mama en mujeres postmenopáusicas mientras que en las premenopáusicas se asocia con una incidencia reducida. En mujeres jóvenes y en postmenopáusicas con acumulo de grasa abdominal y visceral y que practican dietas ricas en grasas animales y carnes, el riesgo se ha visto incrementado (*Willet WC, et al. 2000*).

Consumo de alcohol. Algunos estudios muestran un nexo entre el consumo de alcohol y la incidencia del cáncer de mama, pero esta relación es inconsistente pudiendo haber mayor relación con otros factores dietéticos más que con el alcohol (*Castelló A, Martín M, et al*). No obstante, según estudios epidemiológicos de la Universidad de Oxford, el riesgo se incrementa de forma proporcional a su consumo, así como a la edad de inicio de este (*Willet WC, et al. 2000*).

Consumo de tabaco. No se ha encontrado que sea un factor importante en la etiología del cáncer de mama (*Willet WC, et al. 2000*), aunque algunos estudios sí lo asocian a mayor riesgo (*Castelló A, et al. 2015*). 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.

Estrés. Aún no está establecido, pero no parece existir ninguna relación en distintas situaciones familiares como divorcio, muerte de un familiar, etc., ni en situaciones de estrés moderado (*Kocic B, et al. 2015*). Sin embargo, estudios como el realizado en Ben-Gurion University del Negev in Berr Sheva (<http://esciencenews.com/articles>), consideran que el estrés intenso sí podría influir y tener relevancia a la hora de desarrollar la enfermedad.

II.B.12. Contraceptivos orales.

Existe un ligero aumento en el RR del 1.0 (percentil 95, intervalo de confianza: 0,8 á 1,3) de desarrollar cáncer de mama en aquellas mujeres que se encuentran tomando contraceptivos orales y durante un periodo de 10 años después de haber cesado el tratamiento (*Marchbanks PA, et al. 2002*). No se observa aumento significativo del riesgo de ser diagnosticada de cáncer de mama después de 10 años o más de haber suspendido el tratamiento. Los cánceres diagnosticados en mujeres mientras tomaban anticonceptivos orales tienen más probabilidad de estar clínicamente avanzados que aquellos diagnosticados en mujeres que nunca han utilizado estos fármacos (RR de 0,88). La duración del tratamiento, la edad de inicio de tratamiento, la dosis y el tipo de hormona contenida en el contraceptivo no parecen tener un efecto significativo en el riesgo de padecer cáncer de mama. Aquellas mujeres que empiezan a usar contraceptivos antes de los 20 años parecen tener un RR mayor que las mujeres que comienzan su uso a una edad más tardía. Este aumento relativo coincide con una edad en la que la incidencia de cáncer de mama es, no obstante, muy baja (*Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormonal contraceptives*).

II.B.13. Terapia hormonal sustitutiva (THS).

Entre las mujeres que usan actualmente la THS y aquellas que han cesado su uso hace 1-4 años, el RR de ser diagnosticadas de cáncer de mama aumenta con un factor de 1,023 (1,011-1,036) por cada año de uso. Este aumento concuerda con el efecto de un retraso en la menopausia, porque el RR de cáncer de mama aumenta en las que nunca han utilizado la THS con un factor de 1,028 (1,021-1,034) por cada año más mayor en la menopausia. De esto se deduce que el riesgo de cáncer de mama es mayor cuando se

utilizan combinaciones de estrógenos y progesterona. La THS aumenta la densidad mamaria y reduce la sensibilidad y especificidad de las pruebas de imagen en la mama. Los cánceres diagnosticados en mujeres que toman THS tienden a estar menos avanzados clínicamente que aquellos diagnosticados en mujeres que no han utilizado esta terapia. Estudios actuales sugieren que la THS no aumenta la mortalidad por cáncer de mama (*Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormone replacement therapy*).

III. EVOLUCIÓN HISTÓRICA DEL TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE MAMA.

III.A. Evolución histórica.

La primera descripción del cáncer de mama tiene lugar en el Papiro Quirúrgico de Edwin Smith, escrito en Egipto, que data de unos 3000-2500 años antes de Cristo (a.C.) (*Haeger K. 1993*)(*Die Goyanes A. 1993*). A lo largo de la historia, las mujeres con cáncer de mama se han tratado mediante diversos métodos empíricos, entre los que se incluyen diversos procedimientos médicos y quirúrgicos.

De forma general, el tratamiento del cáncer y, en particular, la neoplasia mamaria, se ha enfrentado a dos factores negativos muy importantes: por un lado al desconocimiento de su etiología y su comportamiento biológico, y por otro, a un pudor mal entendido de las mujeres que han ocultado la enfermedad durante largo tiempo, presentándose el tumor mamario en estado avanzado al ser detectado (*Die Goyanes A. 1993*).

Las mamas han sido durante mucho tiempo símbolo de erotismo y fertilidad. Las mujeres que perdían sus senos eran consideradas inferiores. Muchos códigos de justicia medieval se valieron de estas ideas para castigar ciertos delitos con la pérdida de uno o ambos pechos. Muchas de estas mujeres así castigadas forman parte del Santoral Católico: Santa Bárbara, Santa Cristina, Santa Apolonia y, sobre todo, Santa Águeda, patrona de los cirujanos mamaros y protectora de todas las mujeres afectadas por patología mamaria.

Cuenta la tradición que a Santa Águeda, al rechazar los impulsos amorosos de Quinciano, Gobernador de Catania (Sicilia), en el siglo III de nuestra era, como castigo

le fueron amputadas ambas mamas. Ella con posterioridad se las ofreció a Dios en bandeja de oro y le fueron repuestas milagrosamente (*Haeger K. 1993*) (*Lewisson EF. 1950*).



Figura 6. Grabado del siglo XVII que representa a Santa Águeda con los pechos amputados y sobre una bandeja portada por un ángel. La mujer sujeta en la mano las tenazas de amputar. Dentro del recuadro aparecen otras tenazas similares tomadas de una obra de Sculteus de la misma época.

En el Papiro Quirúrgico de Edwin Smith se mencionan casos de tumores y úlceras mamarias. Se detallan los tratamientos mediante cauterización y se hace hincapié en la dureza tumoral y su crecimiento infiltrativo.

En el Papiro de Ebers (*Haeger K. 1993*) (*Die Goyanes A, 1993*), realizado con posterioridad (1.500 a.C.), se describe por primera vez el cáncer con metástasis axilar. En esta época se realiza la extirpación del tumor con un objeto cortante o la simple cauterización.

Hipócrates (460-377 a.C.) (*Die Goyanes A, 1993*), en sus escritos proporciona el término carcinoma a la enfermedad tumoral, causada como consecuencia del desorden entre la bilis negra, la bilis amarilla y la flema (teoría humoral). Describe también la enfermedad mamaria tumoral diseminada. Asimismo, atribuye el origen del cáncer mamario al cese de la menstruación y sugiere no tratar los cánceres de mama ocultos (no ulcerados) porque se acelera la muerte de las enfermas y solo recomienda extirpar los tumores ulcerados.

Celso (25 a.C.-45 d.C.) (*Die Goyanes A, 1993*) (*Lewison EF. 1953*), nos ofrece la primera descripción clínica del cáncer de mama. Establece que solo los tumores que ocupan menos de la mitad de la glándula mamaria, deben ser extirpados. En sus escritos recopila los aspectos más importantes desde el punto de vista quirúrgico de la enfermedad tumoral mamaria en la época de Roma.

Leónidas, médico griego del siglo I, es considerado el autor del primer procedimiento quirúrgico reglado para tratar el cáncer de mama. Su método consiste en practicar una incisión en tejido sano, que cauteriza a continuación. Las incisiones y la fulguración con fines hemostáticos se suceden hasta que se extirpa el tumor con la totalidad de la mama (*Die Goyanes A, 1993*).

Galeno (121-201), en el siglo II, consolida la importancia de la bilis negra de Hipócrates y adopta su teoría del humoralismo. Establece que el cáncer de mama escirro (carcinoma fibroso) es causado por una acumulación del “humor espeso y lento”, y aconseja tratamientos locales con belladona u óxido de zinc en los casos ulcerados y vitriolo azul en los ocultos. Sin embargo, si el tumor es voluminoso, lo único indicado es la cirugía; que se lleva a cabo de forma amplia, cauterizando los vasos. No obstante, antes de cauterizar, deja sangrar las heridas para expulsar la parte espesa de la sangre,

que según la época, es la causante del cáncer (Figura 7). La mayor parte de los postulados de Galeno, permanecieron en vigor hasta el siglo XVI, ya que la medicina antigua no generó ninguna contribución original posterior (*Die Goyanes A, 1993*) (*De Moulin D. 1983*).

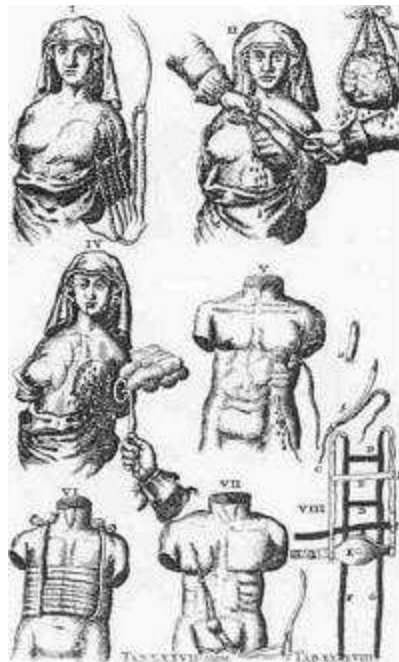


Figura 7: Amputación de una mama seguida de cauterización, tal como la ilustra Sculteus en su *Armamentarium chirurgicum* (1641) (*Haeger K. 1993*).

Durante la Edad Media, se produjeron pocos avances científicos. En esta época no se generaron nuevas ideas sobre la génesis del cáncer de mama ni sobre su tratamiento. Básicamente se mantenían los principios galénicos y la técnica quirúrgica de Leónidas (Figura 8).



Figura 8: Reconocimientos de los pechos según las prácticas descritas en el tratado de cirugía de Teodórico (*Haeger K, 1993*).

Con el renacimiento, el cauterio pierde progresivamente protagonismo, a favor del instrumento cortante. En el siglo XVI, Andrés Vesalio (1514-1564) realiza la extirpación del seno afecto y controla la hemorragia mediante ligaduras. Gracias a sus trabajos anatómicos sobre la glándula mamaria, la cirugía del cáncer de mama se revitaliza (*Haeger K. 1993*).

Ambrosio Pare (1510-1590) ofrece una detallada descripción clínica del cáncer de mama y utiliza también la ligadura vascular en cirugía. En la misma época, Fabricio Hildano (1560-1654), famoso cirujano alemán, propone que el cáncer de mama se origina en la leche coagulada dentro de la glándula mamaria. Fabricio de Aquapendente (1590-1619), es el primer cirujano que recomienda extirpar las adenopatías axilares en un tiempo, junto con la resección del tumor primario (*Die Goyanes A, 1993*) (*De Moulin D*).

Esculeto (1595-1645), cirujano alemán de la época de Renacimiento, nos presenta una técnica quirúrgica mediante ligaduras gruesas a través de la base de la mama para realizar su tracción y así evitar la hemorragia (Figura 9).

Falopio (1523-1562), en la misma época, describe el tumor escirro como una lesión relativamente benigna causada por una acumulación de “humor espeso y lento”. Para este autor, la presencia de sangre durante la intervención, constituye un mal pronóstico para la enfermedad tumoral mamaria.

Estos cirujanos dan mucha importancia a las medidas higienicodietéticas, aconsejando evitar alimentos calientes y aplicarse frío en la glándula mamaria enferma (*Haeger K*) (*Die Goyanes A, 1993*) (*Lewison EF. 1953*).



Figura 9. Técnica de mastectomía según Esculeto (1645) (*Die Goyanes A, 1993*).

En esta época, se piensa que la mastectomía parcial en casos de cáncer de mama, no solo es inútil, sino que acelera la invasión tumoral en el tejido circundante. Pese a la falta de anestesia (que se descubrirá bastantes años más tarde), pronto se descubren métodos agresivos para eliminar por completo el tumor maligno. Bart-helemy Carbol, es el primer cirujano que extirpa el músculo pectoral mayor junto con la mama enferma (*Haeger K. 1993*).

A principios del siglo XVII, Marco Aurelio Severino (1580-1634) practica una mastectomía radical, con extirpación de los ganglios linfáticos axilares. En esta época, se intuye que los ganglios axilares son los primeros órganos en afectarse por la diseminación de la enfermedad. Este autor, distingue por primera vez, la evolución benigna o maligna de los tumores (*Haeger K. 1993*).

A principios del siglo XVIII comienza la Era de la Ilustración; época en que los cirujanos se hacen más científicos. Muchos de ellos consiguen el título de médico y se separan de los barberos, que eran los que practicaban la cirugía de forma empírica hasta ese momento.

En 1680 Silvio establece la teoría linfógena (*Die Goyanes A, 1993*) de la posible diseminación tumoral. La linfa agria o ácida es la causante del cáncer de mama; este postulado, será potenciado por la escuela francesa. Aparece la teoría de un posible “elemento hereditario” que puede ser el causante del cáncer. A su vez, también se sospecha que el cáncer de mama es más frecuente en las mujeres nulíparas.

En esta misma época, se desarrolla la idea de que el tumor mamario se puede diseminar por los vasos sanguíneos y linfáticos hacia los ganglios axilares, los pulmones, el cerebro, y los huesos. Esta afectación a distancia del tumor primario, la

denomina por primera vez metástasis Françoise Le Dran (1685-1770) en 1757 (*Die Goyanes A, 1993*) (*De Moulin D. 1983*).

Angelo Nannoni (1715-1790), médico florentino, publicó en 1746 un libro sobre el tratamiento quirúrgico del cáncer de mama, en el cual exponía ideas asombrosamente modernas para su época. Recomendaba la intervención inmediata, así como extirpar el tumor con un margen amplio, junto con el pectoral mayor, y los ganglios linfáticos axilares próximos (*Haeger K. 1993*).

Jean-Louis Petit (1674-1760), primer presidente de la academia médica francesa, fue el que más influyó en la evolución técnica de las intervenciones mamarias. En su notable “*Tratado de las enfermedades y las operaciones quirúrgicas*” establece el criterio de que el origen del cáncer de mama está en los ganglios axilares, por lo que la mama, el músculo pectoral mayor, y los ganglios axilares, deben ser extirpados en todos los casos (*Haeger K. 1993*). Estas premisas, serán en realidad, el precedente y la base de la mastectomía radical clásica, diseñada por el cirujano americano William Halsted (1852-1922) un siglo después, cuya técnica quirúrgica llegará hasta nuestros días.

A comienzos de la Edad Moderna, ya en pleno siglo XIX, el antiguo humoralismo es abandonado gradualmente a favor de los estudios anatómicos. Las guerras napoleónicas contribuyen también al desarrollo de la cirugía, París es el centro de atracción de médicos y estudiantes de toda Europa y, se empieza a desarrollar una medicina más anatómica. Durante esta época aparece la teoría terapéutica divulgada por Young (1811-1870) que trata los cánceres mamarios mediante técnicas de compresión continua. Este tratamiento fue muy popular porque evitaba complicaciones como la hemorragia y las infecciones graves; aunque, como es natural, no impedía la progresión

de la enfermedad. Arnott, diseña un corsé con un balón de aire para comprimir la mama enferma (De Moulin D. 1983) (Meade RH. 1968). (Figura 10).

Velpeau (1795-1867) en 1854, confecciona la primera gran monografía francesa sobre las enfermedades mamarias, donde introduce el término de “carcinoma en coraza” y, ayudado por los más nuevos y precisos microscopios, distingue tres tipos de cáncer de mama: el escirro, el encefaloide, y el fibroplástico.

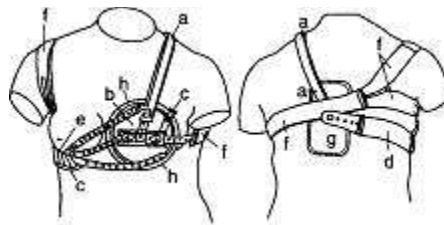


Figura 10: Aparato para compresión de la mama, diseñado por Arnott. (Tomado de: *A Short History of Breast Cancer*, por de Moulin D).

En la segunda mitad del siglo XIX aparecen nuevos conocimientos sobre el cáncer de mama. Carl Von Rokitansky (1804-1878) propone la “Teoría del Blastema”: la albúmina, que es un componente sanguíneo, cuando se altera, puede causar cambios locales en la mama, que pueden conducir al desarrollo del cáncer.

Rudolf Virchow (1821-1902), en 1860, aplica los conceptos celulares al estudio de la histología tumoral y su patogenia, y concluye que el crecimiento de los tejidos se realiza por división de células preexistentes, y que el origen de todos los tumores malignos se debe a cambios heterólogos del tejido conectivo.

Müller (1890-1967) realiza el primer estudio histopatológico de los tumores, descubre que las células malignas pueden circular por el torrente sanguíneo para fijarse en otros órganos y allí crecer de forma independiente.

Todas estas teorías contribuyen a la creencia de que el cáncer es una enfermedad local; y a partir del tumor primario, se extiende a los ganglios regionales axilares, y órganos distantes (*Die Goyanes A, 1993*) (*De Moulin D. 1983*).

Hasta finales del siglo XIX los resultados en el tratamiento del cáncer de mama son muy negativos, con un alto índice de complicaciones y de mortalidad.

En 1879 la clínica vienesa dirigida por Theodor Billroth (1829-1894) es considerada el centro mundial de la cirugía. Este autor, clasifica los cánceres mamarios en cuatro tipos: medular, simple, escirro, y coloide, y relaciona el tipo histológico con la evolución clínica. Inicia sus estudios de patología quirúrgica con el concepto de que el cáncer de mama puede ser diagnosticado desde el punto de vista patológico con seguridad, y propone la mastectomía simple, con la extirpación de los ganglios linfáticos, sólo cuando están aumentados de tamaño (*Haeger K. 1993*).

Durante muchas décadas, se pensó que el cáncer de mama tenía un comportamiento loco-regional: la enfermedad progresaba desde el tumor inicial con invasión progresiva hacia los ganglios linfáticos axilares; y a partir de ahí, se podía diseminar al resto del organismo. Esta fue la teoría “mecanicista” de Halsted, aceptada durante muchos años, y que motivó, por tanto, la agresividad quirúrgica en el tratamiento del cáncer de mama, de forma independiente a su estadio clínico.

William Halsted, introdujo la mastectomía radical en Estados Unidos en 1894, aunque casi todos sus casos fueron de tumores ya avanzados que exigían una resección amplia.

La creencia de la teoría que describía que el cáncer de mama se diseminaba a los ganglios axilares por permeación linfática, contribuyó a la idea de la extirpación en bloque: órgano con tumor primitivo, vasos linfáticos intercurrentes y ganglios regionales. La mastectomía radical de Halsted conllevaba la extirpación inicialmente del músculo pectoral mayor, pero poco después pasaba a extirpar ambos pectorales, vaciando la axila, incluso la fosa supraclavicular y subclavicular (Figura 11). Sus resultados fueron muy superiores a todos los obtenidos hasta el momento, con una importante disminución de la mortalidad, por lo que la mastectomía radical se convirtió en la operación habitual para el tratamiento del cáncer de mama. La mastectomía radical era un modelo de cirugía oncológica, con resultados muy superiores a los obtenidos con anterioridad en cuanto a morbilidad postoperatoria y supervivencia a largo plazo que se mantuvo hasta bien entrado el siglo XX (*Die Goyanes A, 1993*) (*Halsted WS, 1984*), siendo el tratamiento de elección durante más de 50 años.

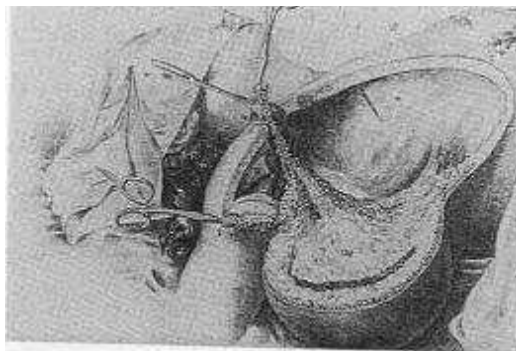


Figura 11: Esquema de la técnica de mastectomía radical de Halsted. (Tomada de: *Contrary to Nature*, por M.B. Shimkin).

El avance que supuso la mastectomía radical, permaneció sin progreso apreciable durante la primera mitad del siglo XX. No obstante, aparecieron nuevas tendencias, unas en sentido más radical, y otras en sentido más conservador, pero todas ellas mantenían la teoría mecanicista por la que el tumor, de comienzo local, se diseminaba de forma ordenada a los vasos linfáticos por permeación, de aquí a los ganglios axilares regionales y, después, al torrente circulatorio.

Siguiendo los trabajos de Handley, que aconsejan el tratamiento de los ganglios linfáticos de la mamaria interna, se describen las mastectomías ampliadas a la cadena de la mamaria interna propuestas por Margottini en 1949, y Urban en 1952. Las técnicas de resección suprarradicales diseñadas por Wangesteen en 1949 y Veronesi en 1967, que añaden la extirpación de los ganglios supraclaviculares y mediastínicos, y, todavía más mutilante, la amputación interescapulomanotorácica de Prudente, son ejemplos de la mayor radicalidad de la cirugía mamaria de la primera mitad del siglo XX (*Die Goyanes A, 1993*) (*Handley WS. 1927*), en un intento de aumentar el número de curaciones.

En los años 1930 y 1960 se inician técnicas quirúrgicas más conservadoras, alentadas por cirujanos como Patey (1930) y Madden (1965). Se respetan, en ocasiones, los dos músculos pectorales consiguiéndose, en esta situación, condiciones cosméticas más aceptables. Los resultados pronósticos de la enfermedad no empeoran respecto a técnicas más radicales. También acontece en esta época otro hecho importante: se comienza a seleccionar pacientes para la cirugía; se establece, por un lado contraindicaciones absolutas para la mastectomía, (Tabla IV) (*Haagensen CD, Stout AP. 1943*) y por otro, la realización de la triple biopsia, descrita por Haagensen en 1943: biopsia de la mama, biopsia del vértice de la axila, y biopsia del primer espacio intercostal de la cadena mamaria interna; si alguna de estas dos últimas eran positivas,

el caso se consideraba no quirúrgico (*Die Goyanes A, 1993*) (*Haagensen CD, Stout AP, 1943*).

Tabla IV. Contraindicaciones absolutas para la mastectomía

Contraindicaciones absolutas para la mastectomía
<ul style="list-style-type: none">• Carcinoma inflamatorio• Metástasis supraclaviculares• Metástasis distantes• Metástasis axilares invadiendo paquete vasculonervioso• Edema linfático del brazo

Pero la auténtica revolución de la cirugía del cáncer de mama se produce en la década de los años 1960 y 1970. Nuevos estudios de biología molecular y la introducción de nuevas especialidades, como la oncología en la década de los años 50 y la radioterapia a principios de siglo, dan un nuevo giro en el manejo de esta enfermedad.

Los estudios prospectivos y aleatorizados de Hayward, Sarrazin, y Veronesi, en los años 70, demuestran que la mastectomía parcial (tratamiento conservador) con disección axilar seguida de radioterapia posterior sobre la mama remanente, consigue iguales resultados que la cirugía radical. Estas observaciones, dan el respaldo científico a este tratamiento, hoy en día aceptado para el manejo del cáncer de mama. No obstante, a pesar de aceptar este tratamiento conservador, existen diferentes criterios a la hora de aplicarlo; (teniendo en cuenta la relación que existe entre el tamaño del tumor y el tamaño de la mama), así como a la hora de elegir la técnica de elección en la extirpación de los ganglios axilares (extirpación de los tres niveles de Berg, extirpación de los

niveles I y II únicamente, o muestreo axilar) (*Die Goyanes A, 1993*) (*Die Goyanes A, 1987*).

En esta década también comienza el desarrollo de las terapias hormonales. Se observa que los estrógenos aceleran el crecimiento de aquellos tumores que son estrógeno-dependientes. Se concluye en estos años que el cáncer de mama es con toda probabilidad una enfermedad sistémica de entrada, y como tal, debe ser tratada desde una esfera multidisciplinar.

Se inicia así la época de la cirugía conservadora, de la mano de los Dres. Fisher, Spittaler, Veronesi y Salvadori, entre otros. Se extirpa el tumor mamario junto a una porción de tejido glandular sano de “seguridad”. El resto de la mama deberá ser tratada con radioterapia, y el componente “sistémico” de la enfermedad, con poliquimioterapia (*Die Goyanes A, 1993*).

III.B. Desarrollo de la disección axilar

¿Qué sucedía desde entonces, con respecto a la disección axilar? Cualquier tumor de mama infiltrante e independiente de su tamaño, llevaba implícita una disección axilar completa. Por tanto, el manejo quirúrgico de la axila apenas había tenido modificaciones desde que Girolano Fabricio, en el siglo XVII extirpara por primera vez, ganglios axilares afectos por la enfermedad.

En la actualidad, y gracias a los métodos de screening mamario, con progresos en la técnica de las mamografías, su aplicación en campañas de detección, así como una mayor información por parte de las autoridades sanitarias y una mayor sensibilización por parte de la mujer, el diagnóstico del cáncer de mama es cada vez más precoz (*Carter CL, et al. 1989*) (*Tabar L, et al. 1999*). Esto ha conllevado a una disminución

del tamaño tumoral, permitiendo realizar un mayor número de intervenciones quirúrgicas más conservadoras, así como a una correlativa disminución de la afectación axilar por la enfermedad. Por tanto, si esto es así, se estaría realizando un número de linfadenectomías innecesarias con la consiguiente morbilidad: paresias, parestesias, linforrea y linfedema crónico (*Giuliano AE, et al. 1996*) (*Silverstein M.J, et al. 1994*).

La situación que podría mitigar esta problemática, sería poder evaluar aquellas pacientes con posible afectación axilar de aquellas que no la presentan, y realizar por tanto, una linfadenectomía selectiva.

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. Hoy en día 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-eosina (H&E), fue un procedimiento rutinario que no permitía el estudio exhaustivo de todos los ganglios, ni dirigía los esfuerzos diagnósticos a uno o dos de ellos específicamente.

III.C. Técnica de biopsia selectiva del ganglio centinela

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 (dolor, incremento en la estancia hospitalaria y linfedema, tanto agudo como crónico, con restricción de los movimientos alrededor del hombro). Otra gran ventaja de la biopsia del ganglio centinela es la realización de la linfadenectomía axilar en el mismo acto quirúrgico, si el resultado es positivo, evitándose así, una segunda intervención. El estudio de dicho ganglio se puede realizar mediante diferentes técnicas, bien sea inmunohistoquímica o reacción en cadena de la polimerasa (PCR), permitiendo de este modo el diagnóstico de micrometástasis (detección de una célula tumoral en un millón de células normales). Esta técnica ha revolucionado el tratamiento del cáncer de mama en la última década.

También se ha establecido cuáles son las pacientes candidatas a la técnica, mujeres con diagnóstico de cáncer de mama en estadios I y II, básicamente tumores menores de 3cm. y sin compromiso axilar al examen clínico. El estudio del ganglio centinela ha permitido disminuir las linfadenectomías aproximadamente en un 60% en estos estadios (*Albertini JJ, et al. 1996*).

El desarrollo de nuevas técnicas en anatomía patológica como la inmunohistoquímica (IHQ), ha aumentado la sensibilidad en la detección de las micrometástasis en un 10% al 20%, frente a la técnica de H&E (*Rydén L, et al. 2007*).

La técnica molecular de Reacción Transcriptasa-Polimerasa en Cadena a 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. La sensibilidad del método de la reacción es capaz de detectar una célula tumoral expresando un único gen en 1×10^6 células ganglionares (*Watson MA, et al. 1999*). Existen varios marcadores genéticos que se expresan en las células de cáncer de mama pero no en las de los ganglios linfáticos normales. Por ello el método de detección de RT-PCR basado en varios marcadores es probablemente el método más eficaz, sensible y de mejor balance coste/beneficio para detectar metástasis ocultas en los ganglios de estas pacientes (*Zehentner BK, et al. 2002*).

Aunque este tumor en estadios precoces es curable, hace imprescindible la participación de diferentes especialidades como anatomopatólogos, biólogos moleculares, radiólogos, cirujanos, ginecólogos y oncólogos, con el fin de ofrecer a la paciente el mejor tratamiento dentro de la evidencia científica disponible actualmente, las nuevas investigaciones y definiciones se enfocan en los conceptos de intervalo libre de recidiva y supervivencia global.

III.D. Clasificación TNM

El sistema TNM es una estrategia para agrupar a las pacientes con respecto a su pronóstico. Además, se pueden formular decisiones terapéuticas, en parte de acuerdo a su categoría, respecto a su clasificación linfonodal, presencia de receptores hormonales en el tejido tumoral, condición menopáusica y estado general de la paciente. El *American Joint Committee on Cancer (A.J.C.C)* (*González-Palacios Martínez, JF. 2004*) ha propuesto cambios de importancia en la clasificación TNM del cáncer mamario dirigidos a una más completa y significativa estratificación de las pacientes atendiendo a las nuevas técnicas diagnósticas y a la introducción de la biopsia del

ganglio centinela. Los cambios más importantes se refieren a: distinción basada en el tamaño tumoral entre micrometástasis y células tumorales aisladas; empleo de identificadores de las nuevas técnicas, inmunohistoquímicas y moleculares; clasificación del estado ganglionar según el número de ganglios con metástasis y una nueva clasificación de las metástasis de ganglios infraclaviculares, de la cadena mamaria interna y supraclaviculares.

La clasificación TNM propuesta en el momento actual se ha visto modificada por la gran influencia de la técnica de la biopsia de ganglio centinela y la detección de micrometástasis (*González-Palacios Martínez, JF. 2004*).

Basado en esta clasificación en función del tumor primario (T), del compromiso de los linfonodos regionales (N) y de las metástasis a distancia (M), se definen unos estadios de cáncer de mama (Tabla V),

Tumor primario (T)

- Tx: tumor primario no evaluable
- T0: Sin evidencia de Tumor primario (no palpable)
- Tis: carcinoma in situ.
 - Tis (DCIS) carcinoma ductal in situ
 - Tis (LCIS) carcinoma lobulillar in situ
 - Tis (Paget) enfermedad de Paget del pezón no asociada a masa tumoral.

Nota: la enfermedad de Paget asociada con tumor se clasifica de acuerdo al tamaño del tumor.

- T1: Tumor menor o igual a 2 cm. en su diámetro mayor.
 - T1mic: Microinvasión $\leq 0,1$ cm. en su diámetro mayor.

- T1a: Tumor > 0,1 cm., pero no > 0,5 cm. en su diámetro mayor.
- T1b: Tumor > 0,5 cm., pero no > 1,0 cm. en su diámetro mayor.
- T1c: Tumor > 1,0 cm., pero no > 2,0 cm. en su diámetro mayor.
- T2: Tumor > 2 cm., pero no >5 cm. en su diámetro mayor.
- T3: Tumor > 5 cm. en su diámetro mayor.
- T4: Tumor de cualquier tamaño:
 - T4a: con extensión directa a la pared del tórax (comprende costillas, músculos intercostales y serrato mayor, no el pectoral mayor y su aponeurosis).
 - T4b: con compromiso de piel (edema, ulceración o nódulos satélites de la piel confinados a la mama).
 - T4c: las dos condiciones anteriores a la vez.
 - T4d: carcinoma inflamatorio.

Nota: la retracción de la piel, del pezón u otro cambio que ocurra en T1, T2 o T3 no cambia la clasificación.

Compromiso de linfonodos regionales (N)

- Nx: linfonodos regionales no evaluables.
- N0: ausencia de adenopatías palpables.
- N1: metástasis axilares homolaterales móviles palpables.
- N2: metástasis axilares homolaterales fijas o metastásicas en mamaria interna, homolaterales detectables por estudios de imágenes (menos linfocintigrafía) o detectables por examen clínico, en ausencia de evidencia clínica de metástasis en linfonodos axilares.

- N2a: metástasis en linfonodos axilares homolaterales fijos entre sí o a otras estructuras.
- N2b: metástasis solo en linfonodos de la mama interna homolateral por imagen y en ausencia de metástasis clínicas en los linfonodos axilares.
- N3: metástasis en linfonodos infraclaviculares homolaterales o metástasis en linfonodos de mama interna homolaterales detectables por estudios de imágenes o examen clínico y la presencia de evidencia clínica de metástasis en linfonodos axilares; o metástasis en linfonodos supraclaviculares homolaterales, con o sin compromiso de linfonodos axilares o de mama interna.
 - N3a: metástasis en linfonodos infraclaviculares homolaterales y linfonodos axilares
 - N3b: metástasis en linfonodos homolaterales de mama interna y linfonodos axilares.
 - N3c: metástasis en linfonodos supraclaviculares.

Metástasis a distancia (M)

- Mx: metástasis a distancia no evaluables.
- M0: sin metástasis a distancia demostrables.
- M1: metástasis a distancia presentes (incluso adenopatías supraclaviculares)

Tabla V. Estadios en cáncer de mama definidos en base a la clasificación TNM. AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) Cancer Staging Manual. 7th edition. New York, NY :Springer; 2010.

Estadios en cáncer de mama definidos en base a la clasificación TNM. (AJCC).		
Estadio 0		Tis N0 M0
Estadio I		T1 N0 M0
Estadio II	Estadio II A	T0 N1 M0
		T1 N1 M0
		T2 N0 M0
	Estadio II B	T2 N1 M0 T3 N0 M0
Estadio III	Estadio III A	T0 N2 M0
		T1 N2 M0
		T2 N2 M0
		T3 N1 M0 T3 N2 M0
	Estadio III B	T4 N0 M0 T4 N1 M0 T4 N2 M0
Estadio III C	Cualquier T, N3 M0	
Estadio IV		Cualquier T, cualquier N, M1

III.E. Técnicas inmunohistoquímicas en el carcinoma mamario.

La determinación de la histología con la técnica de H&E presenta una limitación importante, que es la distribución a distintos niveles de las metástasis en el ganglio linfático (*Cserni G. 1999*). Debido a esto, lo correcto es examinar uno o más cortes teñidos con H&E de cada ganglio (*Treseler PA, Tauchi PS. 2000*). La extracción limitada de muestras de tejido ganglionar puede llevar a resultados falsos negativos.

Las técnicas de IHQ evidencian antígenos presentes en las células tumorales mediante reacciones tintoriales. Dentro de la patología tumoral, las determinaciones inmunohistoquímicas más empleadas son:

III.E.1. Marcadores genéticos.

- 1- Oncogén HER2-neu. Protooncogen codificante para una versión oncogénica del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Esta versión del receptor transmite una señal de proliferación hacia el interior celular en ausencia de factores de crecimiento en el exterior.
- 2- Gen supresor p53. Gen implicado en la regulación del ciclo celular y la apoptosis.
- 3- Ciclina D1. Involucrada en la proliferación y normal diferenciación de la mama gestante.
- 4- Oncogén RAS o proteína p21. Implicado en la transducción de estímulos proliferativos.
- 5- Oncogen c-myc. Codifica para un factor de transcripción nuclear que causa el paso de G0 a G1 en una proliferación celular que no debería ocurrir.
- 6- Oncogen int-2. Provoca un exceso de producción de factores de crecimiento hacia el espacio extracelular, estimulando la proliferación celular.
- 7- Oncogen Bcl-2 y otros oncogenes que codifican productos que afectan a la apoptosis. La sobreexpresión de Bcl-2 suprime la apoptosis.
- 8- Ki67. Antígeno que indica proliferación celular.

III.E.2. Otros marcadores

- 1- Receptores hormonales de estrógenos y progesterona.
- 2- Catepsina-D (CAT.D). Relacionada con la capacidad invasiva del tumor. Es una proteína de síntesis estrógeno dependiente.
- 3- Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).

- 4- Proteína implicada en la respuesta hormonal, pS2.
- 5- Proteínas del shock térmico (HSP 27 y HSP70).
- 6- Cadherina-E. Relacionada con la adhesividad intercelular.
- 7- Menos frecuentemente: proteína relacionada con la haptoglobulina (Hpr), mucinas epiteliales polimórficas (PEM), marcadores de diferenciación apocrina (GCDFP-44), beta-1-glicoproteína específica de la gestación (SP-1), filamentos intermedios (vimentina), colagenasa IV, glicoproteína P (relacionada con respuesta al tratamiento con citostáticos).

Según Rydén y cols (*Rydén L, et al. 2007*), el uso prospectivo tanto de la inmunohistoquímica como de los cortes seriados, para el diagnóstico histológico del ganglio centinela, incrementa la detección de micrometástasis y de células tumorales aisladas.

III.F. Técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en el ganglio centinela.

Mediante la técnica de la RT-PCR es posible detectar la presencia de metástasis de células tumorales mamarias entre células sanas propias de los ganglios linfáticos. Esto se realiza por medio de la detección de marcadores de expresión génica presentes en el tejido mamario (ARN mensajero específico de célula mamaria). En la actualidad se considera que las metástasis linfáticas son el factor pronóstico más importante en esta patología, pero hay pacientes en estadio I (T1N0M0) que fallecen a causa de la propia enfermedad. Debido a esto, la mejor identificación de las micrometástasis en los ganglios linfáticos axilares puede contribuir hacia un manejo más correcto de la

enfermedad, mejorando el pronóstico de la paciente. El estudio de diferentes marcadores de carcinoma mamario es necesario para llegar a la determinación de un marcador que, por un lado, esté siempre presente en las células tumorales y, por otro lado, que esté siempre ausente en los ganglios axilares no afectados. Este marcador no ha sido aún hallado en la actualidad.

A lo largo del estudio de estos marcadores, numerosas secuencias han sido descritas para su uso en la RT-PCR:

1- Citoqueratina 19 (CK19). Uno de los marcadores más extensamente empleados como predictor de la presencia de micrometástasis.

2- MUC-1: Mucina implicada en la adhesión celular. Esta proteína está ausente en ganglios linfáticos normales, mientras que se sobreexpresa en células de cáncer de mama.

3- Maspin. Este inhibidor de la proteasa sérica mamaria está presente en cáncer de mama primario y metastásico, pero no se encuentra en sangre periférica de individuos sanos.

4- Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), puede presentar valores elevados en numerosas neoplasias.

5- Factor de crecimiento tumoral (TGF- β). Citoqueratina involucrada en la regulación de la proliferación tumoral.

6- Antígeno carcinoembrionario (CEA). Importante marcador para el cáncer gástrico y colorrectal, así como en algunos casos de cáncer de mama.

7- Mamaglobina humana (h-MAM). Es un marcador que se expresa exclusivamente en tejido mamario adulto y en un alto porcentaje (80-95%) de los tumores primarios de mama. En concreto se expresa en células epiteliales de la mama, no observándose

presencia en células mioepiteliales ni del estroma mamario. Existen trabajos en los que se describe la ausencia de h-MAM en tumores de mama pobremente diferenciados histológicamente (*Doncella S, et al. 2006*). Otros trabajos determinan que la expresión de mamaglobina se asocia a un fenotipo tumoral de menor agresividad. Todas estas referencias llevan a considerar la h-MAM como un marcador de gran especificidad para la detección de metástasis o micrometástasis (*Doncella S, et al. 2006*) (*Zehentner BK, Carter D. 2004*) (*Ouellette RJ, et al. 2004*) (*Núñez Villar MJ, et al. 2003*) (*Zafrazas M, et al. 2006*) (*Watson MA, et al. 1999*) (*Silva AL, et al. 2002*). Por otro lado existen estudios que consideran necesaria la determinación de genes complementarios debido a la gran heterogeneidad de los tumores mamarios. Autores como Zehentner y cols. (*Zehentner BK, et al. 2002*) han estudiado tres genes: B305D, subunidad π del receptor tipo A de la γ -aminobutirato (GABA π) y B726P. De este estudio se concluye que la determinación por RT-PCR de múltiples marcadores incrementa la sensibilidad diagnóstica y pronóstica en el cáncer de mama.

Por otro lado, algunos de los marcadores mencionados han sido estudiados por otros autores encontrándolos, mediante la técnica de PCR, en individuos sanos. Estos marcadores (CEA, CK-19 y MUC-1) podrían no ser, por tanto, marcadores ideales del cáncer de mama (*Bostick PJ, Chatterjee S, et al.*).

Actualmente se están llevando a cabo estudios sobre la realización de la técnica de la RT-PCR cuantitativa en otros tipos de cáncer con el fin de comprobar si aporta alguna mejora, en cuanto a sensibilidad y especificidad, a la RT-PCR convencional. El desarrollo de esta técnica de RT-PCR cuantitativa rápida podría aportar una alta sensibilidad en el análisis intraoperatorio del ganglio centinela, aumentando la

capacidad del clínico de decidir si realizar o no, en el mismo acto quirúrgico, una linfadenectomía axilar (*Zehentner BK, et al. 2002*).

IV. HISTORIA NATURAL DEL CÁNCER DE MAMA.

La Historia Natural del cáncer de mama trata de establecer la evolución natural de la enfermedad sin intervención terapéutica alguna.

IV.A. Crecimiento intramamario.

Caracterizado por el crecimiento y proliferación acelerada e incontrolada de células pertenecientes al epitelio glandular de los conductos de la mama. Estas células se caracterizan por presentar particularidades propias de las células embrionarias. Son células que sufren un proceso de des-diferenciación, que aumentan su capacidad proliferativa y que no obedecen a las señales de envejecimiento y muerte celular. Estas células, con frecuencia se diferencian adoptando características propias de estirpes celulares diferentes a las de las células que proceden, lo que se conoce como metaplasia.

A escala local el cáncer de mama se comporta siguiendo, al menos, dos patrones diferentes. En ocasiones prolifera lentamente, sin invadir ni infiltrar, ocupando y ensanchando la luz de los ductos y llegando a formar un nódulo prominente que desplaza estructuras vecinas y pudiendo alcanzar gran tamaño sin dejar de ser un cáncer "in situ". Este crecimiento está directamente relacionado con la angiogénesis, por lo que el tumor tiene la capacidad de duplicar su volumen en un periodo de 2 a 9 meses.

En otras ocasiones el cáncer infiltra los tejidos vecinos, rompiendo la membrana basal y se comporta como invasivo muy precozmente, cuando todavía es microscópico y no es posible identificarlo por ningún procedimiento diagnóstico (excepto por biopsia). Se extiende inicialmente al tejido adiposo perimamario y por contigüidad a la piel y tejidos adyacentes. Se ha observado que el tejido muscular tiene cierta resistencia a la invasión tumoral.

La diferencia entre el cáncer "in situ" y el cáncer invasivo es importante porque el diagnóstico precoz garantiza la curabilidad de la casi totalidad del primer tipo de cánceres, pero de un número limitado de los segundos (*Tabar L, et al. 1999*). Además los tratamientos de cánceres 'in situ' de un tamaño mediano o pequeño, no requieren cirugía axilar, cosa que sí ocurre con los tumores infiltrantes, con el consecuente riesgo de linfedema del brazo.

Cuando un cáncer de mama ha comenzado a invadir los tejidos vecinos el cáncer ha comenzado su diseminación. Al inicio las células forman grupos cerrados o "nidos" y en ocasiones pueden verse linfocitos que se disponen rodeando a estos "nidos" o incluso dentro de ellos, lo que supone una forma de respuesta defensiva del organismo frente a lo que ha identificado como un agente extraño a él. La presencia de células tumorales dentro de vasos sanguíneos o vasos linfáticos supone una cierta agresividad o un grado relativamente avanzado de evolución tumoral, lo que empeora el pronóstico.

La afectación de los tejidos vecinos al tumor puede ir más allá de la propia mama en sentido estricto del término: son los tumores localmente avanzados. Estos tumores han llegado a fijar la mama a la pared torácica, invadiendo la fascia subyacente, correspondiente al músculo pectoral, o la piel que cubre la mama.

En el caso de los tumores que progresan de forma local, después de haber ido aumentando de tamaño, comienzan a tornarse más y más duros y a afectar a todos los planos de la mama, incluidas la pared torácica, con fascia, músculos y huesos y provocando la aparición de múltiples nódulos cutáneos. Con el tiempo se afecta toda o casi toda la mama, que llega a perder volumen y a volverse muy dura al tacto, formando un todo sin solución de continuidad con piel y pared torácica. En las fases últimas puede aparecer una ulceración superficial o una fístula hacia los planos más profundos.

En el caso de los cánceres de tipo infiltrante, el tumor aumenta de volumen, pudiendo alcanzar los diez centímetros de diámetro o más, y se extiende a todos los planos de la mama, fijándola finalmente a la piel y/o a la pared torácica.

En algunos casos los síntomas se deben a la presencia de metástasis mientras el tumor primitivo es todavía demasiado pequeño para ser identificado.

La evolución local de los tumores de mama puede llegar a ser causa directa de la muerte de la enferma. Aunque es raro en la práctica, una ulceración superficial puede infectarse y, de no ser tratada correctamente, puede ser causa de muerte. Por otro lado, una ulceración que afecte a la pared torácica puede acabar afectando a la pleura y al pulmón y ser causa de complicaciones que den como resultado la muerte (*Tabar L, et al. 1999*).

IV.B. Diseminación ganglionar.

El paso siguiente del tumor es la afectación ganglionar. La mama posee una rica red de vasos linfáticos que se reúnen en el plexo retroareolar 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 (*Estourgie SH, et al. 2004*).

Se conocen dos vías de diseminación linfática: la vía axilar y la vía de la mamaria interna.

IV.B.1. Vía axilar.

El drenaje linfático en esta vía se realiza escalonadamente, según los niveles de Berg (*Berg JW. 1955*), por lo que el contenido axilar se ha dividido en tres niveles anatómicos, definidos por su relación con el músculo pectoral, como se indica a continuación.

El nivel I corresponde a la región de la axila baja y comprende los ganglios de la cadena mamaria externa, la vena axilar y subescapulares situadas medialmente al dorsal ancho y laterales al pectoral menor en la parte más inferior de la pirámide grasa. Comprende el 60% de los ganglios axilares.

El nivel II corresponde a la región de la axila media e incluye los ganglios de Rotter y centrales que están situados por debajo y al mismo nivel que el pectoral menor. Comprende el 20% de los ganglios axilares.

El nivel III corresponde a la región del vértice de la axila y comprende los ganglios infraclaviculares, que comprenden el 20% de los ganglios axilares, situados por dentro del borde interno del pectoral menor en el ápex de la pirámide, en la entrada de la vena subclavia al mediastino. 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 hematológica. (Este es un concepto que no se relaciona con el ganglio centinela actual.)

En la figura 12 se representan los tres niveles de Berg y otras zonas de drenaje linfático como los ganglios de la cadena mamaria interna, los ganglios supraclaviculares y otros ganglios.

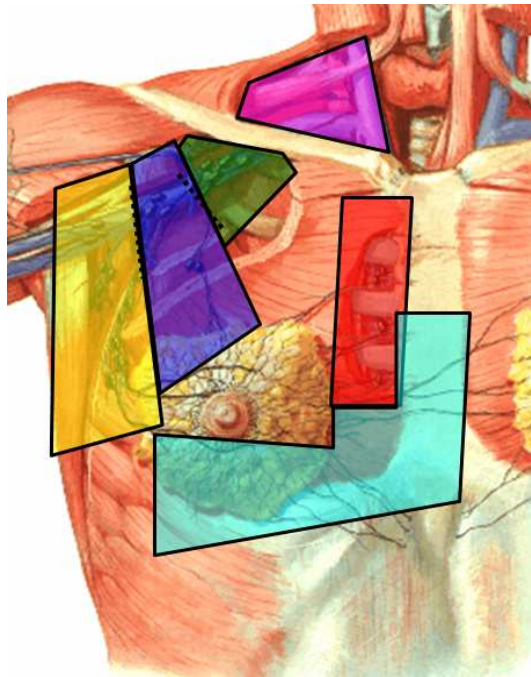


Figura 12: Drenaje linfático según los niveles de Berg. Nivel I en amarillo, nivel II en azul y nivel III en verde. Otras vías de drenaje son, en rojo los ganglios de la cadena mamaria interna, en morado los ganglios de la zona supraclavicular y en azul otros ganglios.

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 (*Estourgie SH, et al. 2004*).

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 (*McDonald JJ, et al. 1953*).

Diversos estudios han demostrado que los ganglios linfáticos del nivel I son positivos en el 96% de todas las pacientes. En teoría la información pronóstica sería suficiente con la disección del nivel I (*Smith JA 3rd, et al. 1977*).

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) (*Rosen PP, et al. 1983*).

El número mínimo de ganglios linfáticos que se deben resear para predecir la positividad se ha discutido, pero Mathiesen y col (*Mathiesen O, et al. 1990*) demostraron que 10 son el número mínimo para estadificar la axila con precisión, lo cual lo han confirmado otros estudios publicados realizados por Krag (*Krag DN. 2010*) o Bland KI y col (*Bland KI, et al. 2003*).

Actualmente en tumores microinvasivos menores de 3cm y en estados precoces se realiza la técnica del ganglio centinela, si ésta 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 del la axila entre un 94% a 98% (*Bland KI, et al. 2003*).

IV.B.2. Vía de la mamaria interna.

A veces un tumor mamario elige un camino poco usual, extendiéndose a la cadena de ganglios del territorio de vena mamaria interna, que se sitúa a lo largo del borde del esternón, por detrás de la pared torácica. En los estudios con designación al azar, realizados por Urban JA y col., no se establecieron ventajas de supervivencia con la extirpación de los ganglios mamaros internos (*Cody HS 3rd, Urban JA. 1995*).

Independientemente de cuál sea el tipo de evolución local, la progresión por la vía del sistema linfático puede ir cumpliéndose a ritmos muy diferentes de un caso a otro. El pronóstico es peor cuando el número de ganglios axilares aumenta y cuando el cáncer ha invadido masivamente un ganglio, le ha hecho crecer infiltrando todas sus capas e incluso ha invadido los tejidos vecinos (*Beechey-Newman N. 2002*).

La afectación ganglionar aislada puede ser causa de la muerte si se produce una afectación masiva de los ganglios del mediastino y un bloqueo linfático que termina en afectación difusa del intersticio pulmonar con derrames en ambas pleuras (*Beechey-Newman N. 2002*).

IV.C. Metástasis.

El proceso de diseminación y metástasis es dinámico, pasando por una serie de etapas. Es necesario que la célula tumoral complete este proceso para originar una metástasis detectable. El resultado final depende de las propiedades intrínsecas de las células tumorales y de la respuesta inmune del hospedador (*Hakim AA. 1988*).

La secuencia puede dividirse en tres etapas: invasión de la matriz extracelular, 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, glucoproteínas 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 glucoproteínas 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 (*Engel J, et al. 2003*). 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 Fidler IJ y cols. (*Ponce ML, et al. 2003*) (*Langley RR, Fidler IJ. 2007*).

Las células epiteliales normales expresan receptores de alta afinidad para la laminina de la membrana basal. Estos son polarizados, disponiéndose 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 (*Demicheli R, et al. 1997*). 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, originando 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 (metalo-proneinasa) en la invasión y metástasis, basado en la observación de que muchos carcinomas poseen altas concentraciones de colagenasa IV, en cantidades 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 (*Demicheli R, et al. 1997*).

El movimiento a través de las zonas degradadas parece que tiene lugar por la secreción de citocinas 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 (*Langley RR, Fidler IJ. 2007*). 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 hospedador (en general son lisadas por los linfocitos 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) (*Langley RR, Fidler IJ. 2007*).

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 (*Langley RR, Fidler IJ. 2007*).

Cada una de las etapas descritas está sometida 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 de ellas tienen la capacidad de implantarse y desarrollarse hacia la metástasis (*Demicheli R, et al. 1997*). No todas las células que se encuentren en un momento dado circulando por el torrente sanguíneo o linfático tienen potencial metastásico y por tanto, relevancia clínica. El motivo es la propia heterogeneidad del tumor, ya que solo unos pocos subclones de células poseen la capacidad adecuada para completar todos los pasos necesarios (*Demicheli R, et al. 1977*).

IV.D. Micrometástasis y técnicas utilizadas para su detección.

El concepto de la micrometástasis en el cáncer de mama fue introducido por Huvos y col. en el año 1971, cuando 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 (*Huvos AG, et al. 1971*).

Se define 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, IHQ y patología 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 (hematógena o linfática) de las células tumorales (*Leong SP, Tseng WW. 2014*).

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 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) (*Guenther JM, et al. 1997*). 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 (*Hartveit F. 1984*). 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 (*Delaloye JF, et al. 2003*).

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

V. CONCEPTOS GENERALES DEL CÁNCER DE MAMA.

V.A. Diagnóstico clínico.

V.A.1. Exploración clínica.

La exploración clínica de la mama debe constar de inspección y palpación de la mama y sus regiones ganglionares.

La inspección de la mama se realiza con la paciente sentada o en bipedestación y realizando una extensión de los brazos por encima de la cabeza. Se ha de valorar la simetría mamaria, retracciones de piel y pezón, alteraciones de la piel y secreción por pezón únicamente si ésta es espontánea.

Durante la palpación en decúbito supino (*Fletcher SW, et al. 1990*), se observa la consistencia glandular, zonas dolorosas, presencia de tumoración, y signos inflamatorios. Además se deben explorar las regiones ganglionares axilares y supraclaviculares.

V.B. Diagnóstico radiológico.

V.B.1. Mamografía.

La mamografía es la técnica fundamental utilizada en la exploración radiológica de la mama. Suele ser suficiente para el diagnóstico o requerir el complemento de otras técnicas, como la ecografía, la resonancia magnética o la punción. En cualquier caso es un estudio inicial que permite elaborar un informe, describir una lesión, localizarla con exactitud, valorar el grado de sospecha para el cáncer y recomendar la actitud para confirmación diagnóstica.

La sensibilidad de la mamografía es del 85% al 90% en mujeres de más de 50 años, del 75% en mujeres entre los 40 – 50 años y probablemente es inferior en menores de 40 años (*Kerlikowske K, et al. 1996*).

La mamografía está indicada en: mujeres sintomáticas, incluso embarazadas, con sospecha clínica de cáncer de mama (*American College of Radiology (ACR)*) (*Comisión Europea*), mujeres asintomáticas de Programas de Cribado para cáncer de mama (*Kerlikowske K, et al. 1996*), mujeres con lesiones clasificadas como probablemente benignas (*ACR, Praticce guideline for the performance of dianostic mammografy.*) (*Vizcaino I, et al. 2001*), mujeres con riesgo aumentado para cáncer (*Collaborative group on hormonal factors in breast cancer*).

Las lesiones detectadas se clasifican en diversas categorías pronósticas (normal, benigna, probablemente benigna, probablemente maligna y maligna) con el fin de protocolizar el seguimiento y la terapia.

Se acepta el sistema BI-RADS para la clasificación de las lesiones, propuesto por la ACR (*Breast imaging reporting and data system.*) (Tabla VI).

Tabla VI. Categorías diagnósticas del sistema BI-RADS.

Categorías	BI-RADS
0	Se necesitan pruebas adicionales de imagen
1	Negativa
2	Hallazgos benignos
3	Hallazgos probablemente benignos
4	Anomalía sospechosa
5	Altamente sugestiva de malignidad
6	Biopsia conocida (malignidad comprobada)

V.B.2. Ecografía de mama.

La ecografía es un método diagnóstico complementario a la exploración clínica o mamográfica.

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

La ecografía se emplea en los siguientes casos: determinación de la naturaleza sólida o quística del nódulo detectado en la exploración física o mamográfica, clasificación de las lesiones sólidas según su probabilidad de malignidad, valoración de nódulos palpables en mujeres jóvenes (<30 años) o embarazadas, valoración de nódulos palpables en zonas mamográficamente no visibles, valoración de algunas asimetrías, así como de abscesos, colecciones o hematomas, como guía en intervencionismo de mama, en mamas densas sintomáticas y en nódulos axilares (*Mehta TS. 2003*) (*Rahbar G, et al. 1999*).

Esta técnica no está aceptada para el cribado de cáncer de mama debido a ciertas limitaciones (*Berg WA, et al. 2006*). No visualiza las microcalcificaciones del carcinoma ductal in situ y, en mamas muy voluminosas, algunas masas pueden pasar inadvertidas, así como los nódulos sólidos en mamas grasas (*Shin HJ, et al. 2015*).

V.C. Procedimientos diagnósticos intervencionistas.

El objetivo principal es la obtención de una muestra válida para estudio citológico, histológico, inmunohistoquímico, o para resolver un problema clínico

mamario y de ese modo disminuir el número de procedimientos quirúrgicos, con una seguridad diagnóstica similar (*O'Higgins N, et al. 1998*) (*Klijanienko J, et al. 1998*).

V.C.1. Diagnóstico citológico.

Se emplea la punción aspiración con aguja fina (PAAF) de calibre 21 a 28G. Proporciona un diagnóstico rápido y eficiente de sospecha de malignidad (*Buchbinder SS, et al. 2001*).

V.C.2. Diagnóstico histológico.

Se realiza un biopsia con aguja gruesa de 18-16-14G (BAG) (*Parker SH, et al. 1991*), biopsia asistida por vacío con agujas 8G-11G (BAV) (*Fine RE, et al. 2003*), o bien Advanced Breast Biopsy Instrumentation (ABBI) (*Lifrange E, et al. 2001*).

V.C.3. Señalización de lesiones.

Se trata de la colocación de un marcador metálico para un procedimiento diagnóstico o terapéutico (*Rosen EL, Vo TT. 2001*) (*Kruger BM, et al. 2002*) (*Alonso-Bartolome P, et al. 2002*).

V.D. Otros procedimientos diagnósticos.

V.D.1. Galactografía.

Establecida para la detección de una masa intraductal. Permite la señalización de la misma, guiada con ecografía o mamografía (*Slawson SH, Johnson, BA. 2001*).

Está indicada en secreción espontánea no lechosa, hemorrágica o con citología patológica, por uno o varios orificios, generalmente unilateral.

Es contraindicación la existencia de procesos inflamatorios o hipersensibilidad a contrastes yodados.

V.D.2. Resonancia magnética de mama.

Es una técnica de imagen de gran sensibilidad para la detección de cáncer de mama aunque sus limitaciones en la especificidad obligan a restringir sus indicaciones y asociarla siempre a las demás modalidades de imagen (*Sentís M, Camps J. 2005*).

Ayuda a diferenciar lesiones indeterminadas o zonas cicatriciales confusas en la mamografía. Es útil para evaluar pacientes con prótesis mamaria, ayuda a detectar focos multicéntricos o multifocales y a valorar la extensión de la lesión.

V.D.3. Lifogammagrafía.

Se trata de inyectar una sustancia indicadora (trazador), marcada con un isótopo radiactivo, en una zona próxima al tumor de la mama. El trazador circula por los vasos linfáticos hasta depositarse en el primer ganglio que recibe el flujo del tumor. De esta forma la linfogammagrafía se emplea en la identificación del ganglio centinela (*Li C, et al. 2015*).

V.D.4. PET o PET-TAC y SPECT-TAC

En la PET o PET-TAC (tomografía por emisión de positrones) se utiliza un isótopo radiactivo, introducido en el cuerpo humano en forma de coloide, como parte de moléculas biológicamente activas, que produce un positrón. Este positrón se aniquila después con un electrón para producir dos rayos gamma. Estos dos rayos gamma salen

en direcciones opuestas y su detección simultánea permite localizar el isótopo de forma precisa.

En la SPECT-TAC (Tomografía computarizada de emisión monofotónica) el procedimiento es similar al de la PET, pero es el isótopo el que produce directamente el rayo gamma. La detección del isótopo en esta técnica no es tan precisa como en la PET, pero resulta más simple debido a que se pueden emplear isótopos de más fácil obtención y con una vida media más larga.

Esta técnica permite una mejor detección de los ganglios centinela ya que sitúa mejor los depósitos de coloide en los tres niveles axilares y detecta mejor trazas dérmicas de coloide que la linfogammagrafía, mejorando la detección (*Mucientes Rasilla J, et al. 2008*).

Actualmente no hay establecida ninguna indicación para el diagnóstico del cáncer de mama (*Rodríguez Garrido M, Asensio del Barrio C. 2004*). Su mejor aplicación se realiza 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 óseas, pero es insuficiente en las lesiones osteoblásticas, por lo que no reemplaza la gammagrafía. También tiene impacto en el seguimiento terapéutico.

V.E. Diagnóstico anatomopatológico.

V.E.1. La punción aspiración con aguja fina (PAAF).

Se considera una prueba alternativa en centros en los que el servicio de Anatomía Patológica disponga del personal adecuado para realizarla con una suficiente seguridad (*Wang HH, Ducatman BS. 1998*). Puede ser utilizada como técnica de

elección o simplemente como apoyo en el diagnóstico no solo en las lesiones mamarias, palpables y no palpables, sino también en las adenopatías axilares y en las posibles recidivas o metástasis cutáneas.

V.E.2. Biopsia con aguja gruesa (BAG).

Es un procedimiento diagnóstico que consiste en la obtención transcutánea de tejido mamario con agujas de grosor variable en forma de cilindros que son procesados con la técnica histológica convencional. La obtención de varios cilindros de tejido evita la necesidad de cirugía abierta para el diagnóstico de patología benigna, y permite el diagnóstico de malignidad, lo que hace posible una adecuada programación del tratamiento (Jacobs TW, et al. 2002) (Hoda SA, Rosen PP. 2002). Proporciona además material suficiente para la realización de técnicas inmunohistoquímicas para evaluar el estado de los receptores del estradiol y la progesterona o la valoración de proteínas tumor-supresoras como p53, y con valor predictivo de respuesta como Her-2, mediante inmunohistoquímica o FISH (Kaneko S, et al. 2002).

Más recientemente se ha introducido en la práctica clínica la biopsia con aguja asistida por vacío, habitualmente utilizada con agujas de 11 o 9G, que permite la obtención de mayor cantidad de tejido (Park HL, Hong J. 2014).

VI. FUNDAMENTO DEL GANGLIO CENTINELA

El cáncer de mama, se disemina generalmente por vía linfática hacia los ganglios de la axila homolateral.

VI.A. Ganglio centinela

El ganglio centinela es el ganglio que primero recibe las células malignas desde el tumor primario y, que con la máxima probabilidad, albergará una diseminación metastásica inicial (*Acea Nebril B, et al. 1999*).

La presencia o ausencia de afectación de los ganglios axilares es un importante factor para el estadiaje del cáncer de mama, que influirá de forma directa en su pronóstico (*Donegan WL. 1997*) (*Jatoi I, et al. 1999*). La presencia de metástasis en los ganglios regionales está relacionada con una menor supervivencia. Actualmente, y debido a un diagnóstico más temprano, del total de pacientes intervenidas por cáncer de mama, un alto porcentaje (el 76,2% según Cox y cols.) presentan ganglios axilares negativos (*Cox C.E., et al. 1998*).

Existe una elevada morbilidad que acompaña a la linfadenectomía axilar: la sensación de hormigueo y las parálisis parciales del brazo intervenido por lesión de nervios sensitivos, lesiones vasculares, serosas y, el problema más importante e invalidante: el linfedema crónico. Esta complicación linfática, tiene un difícil manejo terapéutico, y se presenta, según diversas series publicadas, en un 10- 30% de las pacientes a las que se les practica este tipo de cirugía (*Warmuth MA, et al. 1998*).

Todo esto supone un gasto sanitario añadido, prolongación de estancias hospitalarias, limitación laboral, disminución de calidad de vida, y una carga psicológica sobreañadida para la mujer (*Boyero M, et al. 1999*).

Las tendencias actuales, van encaminadas a preservar los ganglios axilares en aquellas mujeres que los tengan libres de enfermedad. Si un método diagnóstico no invasivo, o mínimamente invasivo, pudiese proporcionar la situación preoperatoria precisa de la axila, se podría evitar la disección axilar en aquellas pacientes en las que no se detectaran ganglios afectados. Con esta finalidad, se ha tratado de encontrar técnicas y gestos quirúrgicos menos agresivos que nos permitan conocer el estado axilar.

La afectación ganglionar es uno de los factores con mayor valor predictivo en cuanto al pronóstico de la enfermedad, y que puede condicionar la indicación de tratamiento adyuvante. En la actualidad existe controversia en cuanto a la realización de la linfadenectomía selectiva, sobre todo en estadios I y II de la enfermedad, dada su morbilidad, por lo que se han desarrollado otras técnicas alternativas.

La biopsia selectiva del ganglio centinela en el cáncer de mama ha sido desarrollada para calcular con precisión el estado de los ganglios linfáticos axilares, sin necesidad de extirpar todo el contenido linfático axilar (*Veronesi U, et al. 2003*).

Podemos considerar la biopsia del ganglio centinela como una nueva modalidad de estadiaje ganglionar del cáncer de mama. Esta técnica ha ido ganando aceptación por su elevada fiabilidad, y empieza a configurarse como una alternativa válida a la disección axilar convencional sistemática (*Ishikawa H, et al. 2002*) (*Gulec SA, et al. 1998*) (*Giuliano AF. 1996*).

El concepto del ganglio centinela, aplicado al cáncer de mama, se basa en la hipótesis de la diseminación secuencial (*SaKorafas G, Tsiotou A. 2000*). Esta hipótesis concibe que un tumor maligno primario drena inicialmente hacia un determinado ganglio linfático, ubicado en un grupo ganglionar regional.

El ganglio centinela es este ganglio particular que recibe las primeras células malignas desprendidas del tumor mamario primario (*Noguchi M. 2002*) (*Borgstein PJ, et al. 2000*).

Según la hipótesis anteriormente expuesta, si este primer ganglio no está afectado cabe suponer que el resto de ganglios de la axila estén libres de enfermedad. Si por el contrario, este primer ganglio está afectado, caben a su vez dos posibilidades, que el resto de axila esté afectada o que esté libre de enfermedad.

La detección y estudio histológico y molecular de este ganglio, podría determinar qué pacientes serían candidatas a linfadenectomía axilar, y qué pacientes aún teniendo cáncer de mama no la precisarían, por lo que disminuiría así la morbilidad asociada a la cirugía.

La búsqueda del ganglio centinela aplicada al cáncer de mama, se basa en la inyección de una partícula de un determinado tamaño marcada con un isótopo radiactivo, asociado o no a un colorante como segundo método de búsqueda. Estas sustancias permiten localizar el ganglio centinela bien realizando una gammagrafía preoperatoria, o bien intraoperatoriamente observando el trayecto del colorante o en los casos precedidos de inyección de isótopo radiactivo utilizando una sonda detectora de radiaciones gamma. Una vez localizado el ganglio centinela, se procederá a su extirpación y estudio (*McMasters KM, et al. 2000*) (*Noguchi M. 2002*) (*Schwartz GF, et al. 2002*).

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 son las que se recogen en la actualización del consenso sobre la biopsia selectiva del ganglio centinela en el cáncer de mama 2010, realizado por la Sociedad Española de Senología y Patología mamaria (Bernet, L, et al. 2010).

- Se recomienda en carcinomas T1 y T2 siempre que la axila sea clínica, ecográfica y patológicamente negativa.
- En los casos de tumores multifocales es posible realizar biopsia selectiva del ganglio centinela (BSGC) y en los multicéntricos es aceptable con nivel de evidencia IV.
- En los casos de carcinoma intraductal extenso (mayores de 4 cm de diámetro) y de alto grado y/o con comedonecrosis y/o en los que vayan a tratarse con mastectomía.
- En el carcinoma de mama en el varón se podrá aplicar siguiendo las mismas indicaciones que en la mujer.
- La realización de una biopsia escisional previa no contraindica la realización de la BSGC siempre que no aparezcan criterios de exclusión.
- En pacientes con axila clínica o ecográficamente negativa de inicio, es recomendable la realización de la BSGC previa al tratamiento sistémico primario con un nivel III de evidencia. Es aceptable su realización posterior al tratamiento sistémico primario en el contexto de ensayos clínicos
- No existe evidencia para desaconsejar la BSGC en mujeres gestantes o púerperas lactantes, previa retirada de la lactancia 24h. Se recomienda utilizar la

mínima dosis posible y el mismo día de la cirugía. En estos casos está contraindicado el uso de cualquier colorante vital.

- En los casos de cirugía mamaria plástica de aumento o reducción previa no existe evidencia para contraindicar la BSGC.
- En pacientes con cirugía conservadora con BSGC previa por carcinoma no hay evidencia para contraindicar una nueva BSGC, aunque es aconsejable la valoración individual de cada caso.

Sin embargo, el empleo de esta técnica está contraindicada en algunas situaciones: en carcinoma localmente avanzado cuando hay afectación ganglionar, ni antes ni después de la terapia sistémica primaria; cuando existe la sospecha de afectación ganglionar mediante pruebas de imagen (ecografía) y, al menos, citología compatible con metástasis de carcinoma de las adenopatías sospechosas; y en carcinoma inflamatorio.

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. Estos falsos negativos pueden tener su origen en diversos factores que parece que tienen una cierta influencia en la aplicación de la técnica o en la propia paciente.

Las pacientes con edad avanzada presentan alteraciones de la circulación linfática, que pueden 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. (*Cox CE, et al. 2002*).

También se ha observado que en las pacientes obesas se puede dificultar la migración del marcador (*Cox CE, et al. 2002*).

Refiriéndonos a la multicentricidad, artículos recientes concluyen que la biopsia de ganglio centinela en cáncer de mama multicéntrico es factible y precisa y que, por tanto, debe practicarse. (*Van la Parra RF, et al. 2014*). En la actualidad se realiza la biopsia mediante punción periareolar del radiotrazador.

Cuando el estudio del ganglio centinela es necesario realizarlo en pacientes gestantes, la biopsia de ganglio centinela es segura siempre que se utilice azul de metileno o el isótopo 99-Tc. (*Gropper AB, et al. 2014*).

En pacientes sanas con mutación del gen BRCA, la técnica del ganglio centinela no añadiría morbilidad en caso de ser candidata a una mastectomía profiláctica. (*Vidal-Sicart S, Valdés Olmos R. 2012*).

Por último, no estaría contraindicada la biopsia del ganglio centinela ni en pacientes portadoras de prótesis mamarias (*Vidal-Sicart S, Valdés Olmos R. 2012*), ni en pacientes con cirugía previa en glándula mamaria (*Vidal-Sicart S, Valdés Olmos R. 2012*).

Sin embargo no existe evidencia para recomendar esta técnica a pacientes con cirugía previa y con técnica del ganglio centinela realizada (*Vidal-Sicart S, Valdés Olmos R. 2012*).

VI.B. Estudio de las metástasis en ganglio centinela

El estudio de las metástasis en el ganglio centinela se realiza 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.

Existen métodos morfológicos que pueden ser empleados durante el acto quirúrgico como la citología por improntas, utilizando la coloración de H&E; o como el análisis de secciones múltiples congeladas.

Otros métodos morfológicos se realizan con posterioridad al acto quirúrgico, como la histología clásica con la coloración de H&E; o como la IHQ.

Existen también métodos no morfológicos que se realizan con posterioridad a la cirugía, como el empleo de la citometría de flujo y el análisis molecular.

VII. FACTORES PRONÓSTICO DEL CÁNCER DE MAMA

Debemos tener en cuenta que los conceptos de factores pronóstico y factores predictivos son diferentes.

Los factores pronóstico indican asociación con un periodo libre de enfermedad, teniendo en cuenta el potencial invasivo o metastásico del tumor en el momento del diagnóstico.

Los factores predictivos se refieren a la respuesta a un tratamiento concreto. En ocasiones constituyen diana para ese tratamiento, o bien actúan como moduladores de la función de dicha diana.

Un factor es considerado factor pronóstico útil: si presenta un valor pronóstico significativo, independiente, validado y clínicamente probado; su cuantificación debe ser reproducible y estar disponible; su resultado debe ser fácilmente interpretado por el clínico y su medición no debe consumir o inutilizar tejido necesario para el estudio anatomopatológico (*NIH consensus conference*).

Actualmente ninguno de estos factores cumple estos criterios en su totalidad, por lo que se consideran válidos aquellos que mejor cumplan los criterios.

Según el Colegio Americano de Patólogos (CAP), los factores pronóstico y predictivos están categorizados en tres grupos o niveles (*Fitzgibbons PL, et al. 2000*):

- 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 Her-2neu.

- 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.

VII.A. Factores pronóstico clásicos

Los factores pronóstico aceptados tradicionalmente son: el estado de los ganglios axilares, el tamaño tumoral, el grado tumoral, el tipo histológico, la invasión del estroma y la invasión vascular.

VII.A.1. Afectación ganglionar

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 supervivencia 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 supervivencia es del 64.5% y con 4 o más ganglios linfáticos positivos la supervivencia decae a un 34.5%. Obviamente si los ganglios linfáticos axilares se observan comprometidos macroscópicamente el pronóstico es desfavorable (*Page DL*).

Se ha publicado que las pacientes con micrometástasis estudiadas en secciones microscópicas seriadas y que son menores de 2 mm, tienen una supervivencia comparable con las pacientes sin metástasis ganglionares (*Page DL, 1991*).

En una investigación prospectiva del grupo de estudio internacional del cáncer de mama (GEICAM), se estudiaron los ganglios axilares homolaterales considerados negativos. Se realizaron cortes seriados y después de realizar el estudio histológico sistemático, se encontraron micrometástasis en un rango del 9 y 20%. Estas pacientes con micrometástasis tuvieron menos tiempo de supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global después de 5 años, que aquellas cuyos ganglios se mantuvieron negativos después de estudiarlos con cortes seriados (*Colomer R, et al. 2004*).

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 (<http://www.hvn.es/>).

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 (<http://www.hvn.es/>).

Las pacientes con metástasis de los ganglios linfáticos supraclaviculares y de la cadena mamaria interna tienen una supervivencia a los 5 años del 56% y 52% respectivamente y en caso de ser las dos regiones afectadas la supervivencia es del 24%.

Las metástasis en los ganglios supraclaviculares son de mal pronóstico, ya que por lo general son alcanzados después de comprometer los ganglios axilares y de la mamaria interna (<http://www.hvn.es/>).

VII.A.2. Tamaño tumoral

El tamaño macroscópico de las neoplasias malignas primarias infiltrantes 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 (<http://www.hvn.es/>).

VII.A.3. Grado Tumoral. Escala de ELSTON

Los métodos para la graduación histológica en el cáncer de mama se describieron por primera vez hace más de 50 años.

Bloom en 1950 propuso un método que valoraba tres factores (*Bloom HJG. 1950*): el grado de formación de túbulos, la regularidad en el tamaño, la forma y las características de tinción nuclear y la hiper cromasia 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 (*Bloom HJG, Richardson WW. 1957*).

Posteriormente, el método de Bloom y Richardson sufrió nuevas modificaciones para establecer unos criterios más objetivos. Este método revisado, llamado escala de Elston (*Elston C, Ellis I. 1991*), conlleva una evaluación semicuantitativa de tres características morfológicas: el porcentaje de formación de túbulos, el grado de pleomorfismo nuclear y el conteo mitótico preciso dentro de un área definida.

De este modo se consiguen tres grados de diferenciación: grado I (bien diferenciado), grado II (moderadamente diferenciado) y grado III (pobrementemente diferenciado).

VII.A.4. 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% (<http://www.hvn.es/>).

VII.A.5. 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 (<http://www.hvn.es/>).

VII.A.6. Invasión Vascular

La invasión linfática y peritumoral 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 (<http://www.hvn.es/>).

VII.B. Factores pronóstico biológicos

Existe un porcentaje considerable de pacientes que presentan progresión de la enfermedad a pesar de un aparente pronóstico favorable según los factores pronóstico clásicos.

Esto nos lleva a la necesidad de estudiar otros factores pronóstico como genes o marcadores bioquímicos, que proporcionen información adicional acerca del comportamiento más o menos agresivo de los tumores y permitan afinar en las terapias suministradas.

VII.B.1. Cinética Celular

Este factor pronóstico tiene la ventaja de que es cuantificable, objetivo, independiente del estado de los ganglios axilares, y aplicable 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 ADN 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 recidivar 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 ADN que consiste en comparar el contenido del ADN de las células tumorales con el de las células benignas (<http://www.hvn.es/>).

VII.B.2. Receptores Hormonales

Los estrógenos y progestágenos son hormonas esteroideas 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 menarquia a la menopausia). Tras la menopausia, la actividad de las aromatasas periféricas transforma los andrógenos suprarrenales en estrógenos, suministrando estímulo hormonal al 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 y se cree que el aumento de la expresión de receptores esteroideos es un evento clave e inicial en la tumorigénesis mamaria (<http://www.hvn.es/>).

El tejido mamario que sobreexpresa 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 (*Mason BH, et al. 1983*) en el que se determinó la expresión del receptor de progesterona y del receptor de estradiol 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 RE y RP. 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 (*Grann VR, et al. 2005*). 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 (*Grann VR, et al. 2005*).

Así, según Pujol y cols. (*Pujol P, et al. 1994*) y Costa y col. (*Costa SD, et al. 2002*), a los 5 años tras el diagnóstico del cáncer de mama la importancia pronóstica derivada de la expresión de RE y RP se pierde, en parte porque la replicación tiende a volverse hormonoindpendiente con el avance de la enfermedad. Sin embargo, Chang y col. (*Chang J, et al. 2003*) 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 RP y no del RE 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 gracias 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 (*Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Lancet. 1998*), en el que se analizan 36.689 pacientes incluidas 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%.

Por todo esto, la detección de receptores hormonales se considera un potente factor predictivo, ya que informa de la respuesta a la terapia hormonal. Además se considera también factor pronóstico ya que las pacientes de cáncer de mama con RH positivos muestran mejor pronóstico en los primeros 5-10 años (*Grann VR, et al. 2005*).

VII.B.3. Sobreexpresión del oncogén HER-2neu

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 delecta el extremo carboxi terminal 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 HER-2neu (erbB-2 o neu). Es un gen localizado en el cromosoma 17q12. Codifica para 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 HER-2neu se encuentra en un 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 pronóstico en la supervivencia en pacientes con ganglios positivos respecto a la no expresión (<http://www.hvn.es/>).

El gen HER-2neu humano codifica una proteína de 1255 aminoácidos perteneciente a la familia de los receptores tirosín-quinasa (RTK). El producto del HER-2neu 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 HER-2neu se expresa a concentraciones bajas en diversas células normales, en varios cánceres se sobreexpresa. 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 HER-2neu en el cáncer de mama es múltiple: el cáncer de mama evoluciona desde la lesión premaligna no invasiva (carcinoma in situ) hasta el carcinoma metastásico, pasando por los estadios localizados. Es posible encontrar la sobreexpresión del HER-2neu 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 HER-2neu. Hay un trabajo con gran implicación clínica en este aspecto, de Niehans y cols, realizado en 30 pacientes. En él analizaron en autopsia con inmunohistoquímica la expresión de esta oncoproteína. De los 30 pacientes, 18 sobreexpresaban el HER-2neu en las metástasis, 15 (80%) de los cuales lo sobreexpresaban en todas. Todos los pacientes con sobreexpresión en tumor primario, mostraban sobreexpresión en las metástasis (*Niehans GA, et al. 1993*).

Algún trabajo sugiere que la prevalencia de sobreexpresión del HER-2neu en lesiones metastásicas a distancia es mucho mayor del 30% presente en las lesiones localizadas en la mama, sugiriendo una selección positiva de los clones celulares que sobreexpresan este factor, por ejemplo, el trabajo de Braun y col. (*Schindlbeck C, et al.*

2004) encuentra en médula ósea una prevalencia del 60% de sobreexpresión del HER-2neu 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 HER-2neu está relacionada con la resistencia a tratamientos quimio/hormonales en el cáncer de mama avanzado (*Taucher S, et al. 2003*).

El “Gold Standard” para la determinación de sobreexpresión del HER-2neu en cáncer de mama es el FISH (Hibridación in situ fluorescente). Dicha técnica detecta directamente la amplificación del gen. Actualmente se acepta la técnica CISH (hibridación in situ cromogénica), con una sensibilidad y especificidad similar al del FISH. La detección de la proteína HER-2neu por inmunohistoquímica (Herceptest®; se divide el resultado en 4 grupos de expresión: 0-1-2-3) por anatompatólogos expertos presenta una correlación mayor al 90% con el FISH o CISH (*Kröger N, et al. 2006*).

Tabla VII.

Tabla VII: Clasificación de expresión de HER2-neu.

Clasificación	Patrón de inmunohistoquímica	HER2-neu estatus	FISH
0	Inmunomarcación negativa, o bien, inmunomarcación positiva en menos del 10% de las células tumorales.	Negativo.	No indicado.
1+	Reacción débil en más de 10% de las células tumorales.	Negativo.	No indicado.
2+	Reacción débil a moderada en más de 10% de las células tumorales.	Positividad débil.	Indicado.
3+	Reacción fuerte y completa. Marca todo el contorno de la membrana en más de 10% de las células tumorales.	Positividad fuerte.	No indicado.

VII.B.4. 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 cols. estudiaron la relación entre catepsina D, la proteína HER-2neu y la amplificación del oncogén c-myc, encontrando que no se relaciona con la expresión del HER-2neu, pero sí con la amplificación del oncogén c-myc (*Brouillet JP, et al. 1990*).

VII.B.5. Índice de proliferación: Ki67

El anticuerpo monoclonal Ki67 es un marcador de proliferación celular. 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 así como en periodos de reposo, no se detecta este antígeno. El Ki67 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.

(<http://www.hvn.es/>)

La tasa de proliferación celular se incluye dentro del grado histológico al formar parte de este el porcentaje de mitosis, pero no se ha podido demostrar que estos marcadores de proliferación celular den información adicional al grado histológico (*Yerushalmi R, et al. 2010*). Debido a esto, la guía de la ASCO (American Society of Clinical Oncology) no incluye el Ki67 entre los factores pronóstico necesarios (*Harris L, et al. 2007*). Además, las últimas revisiones ponen de manifiesto que no hay estudios randomizados suficientes para asegurar su valor pronóstico aislado (*Yerushalmi R, et al. 2010*).

No obstante, la guía clínica del cáncer de mama de la sociedad española de oncología mamaria (SEOM) incluye el Ki67 entre las determinaciones rutinarias recomendadas en la clínica diaria (*Guerra JA, Moreno F. 2007*).

VII.B.6. Gen p53

La proteína p53 es una proteína oligomérica que se une al ADN cuya función es desencadenar respuestas celulares al daño del ADN. 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 ADN y si el daño del ADN 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 ADN 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 (*Harris L, et al. 2007*).

VII.B.7. Activadores del sistema uroquinasa-plasminógeno

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) promueven la invasión tumoral por medio de la degradación de la matriz extracelular, e 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 (*Duffy MJ, et al. 2014*).

El principal problema metodológico para su valoración, es la necesidad de al menos 300 mg de tejido tumoral fresco/congelado para su determinación, cantidad considerable que impide su implantación como una herramienta de rutina. El valor predictivo de este marcador podría ser mayor si se mejoran sus métodos de detección, ya fuera por micro-ELISA, inmunohistoquímica o sobre tejido fresco obtenido de biopsia, trucut o PAAF. (<http://www.hvn.es/>).

VII.B.8. 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 (*Armes JE, et al. 1999*).

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 ADN a nivel de todos los tejidos, no tratándose por tanto de síndromes específicos de cáncer de mama (*Kerangueven F, et al. 1997*). 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, RP 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.

VII.B.9. 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 Centre*, en 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 ADNc, 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 30.000 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. Algunos autores consideran que esta herramienta es la que más información aporta sobre el comportamiento del cáncer de mama temprano. (*Martín M, et al. 2009*).
- 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, pero requiere validaciones prospectivas para su implantación.

VII.B.10. Mamaglobina

En 1996 Watson y Fleming aislaron un ADNc desconocido a partir de una muestra de adenocarcinoma mamario, y denominaron a este nuevo gen mamaglobina humana (hMAM) (*Watson MA, Fleming TP. 1994*) (*Watson MA, Fleming TP. 1996*). La mamaglobina exhibe homología con varias proteínas secretorias epiteliales, formando parte de la superfamilia de las secretoglobinas (SCGB) (*Watson MA, et al. 1998*) (*Klug J, et al. 2000*). Las SCGB son un grupo de proteínas pequeñas de secreción, raramente glucosiladas, que forman homodímeros, heterodímeros y heterotetrámeros, y que se expresan principalmente en tejidos mucosos (*Zafrazas M, et al. 2006*). Todavía no hay una función fisiológica aceptada para ninguna de las SCGB, aunque algunas de ellas se han implicado en el desarrollo del cáncer (*Sjödin A, et al. 2003*), en la señalización, en la regulación del sistema inmunitario, en la quimiotaxis y, posiblemente, en el transporte de moléculas aromáticas como hormonas esteroideas y bifenilos (*Lacroix M. 2006*) (*Carter D, et al. 2002*).

Las proteínas de la superfamilia de las SCGB están presentes en los mamíferos y las aves (*Zehentner BK, Carter D*), y la cantidad de miembros crece continuamente. En la actualidad se conocen 9 SCGB humanas (*Zafrazas M, et al. 2006*), entre las que se encuentra la mamaglobina A (MGA). La MGA y la mayoría de los otros miembros

humanos se localizan en el cromosoma 11q12.3-13.1, donde se encuentran de manera agrupada (Watson MA, et al. 1998) (Ni J, et al. 2006) (Figura 13). Esta región está frecuentemente amplificada en neoplasias de mama (Watson MA, et al. 1998).

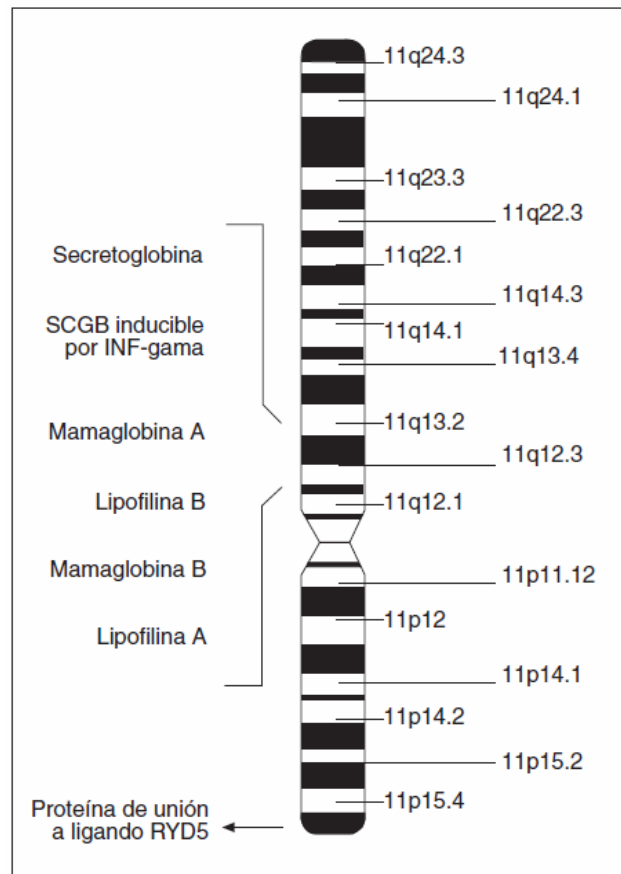


Figura 13: Localización del gen de la mamaglobina A (MGA) y otros genes de la familia de las uteroglobinas en el cromosoma 11. SCGB: secretoglobinas.

El ADNc de la MGA codifica un polipéptido de 93 aminoácidos con una masa molecular de 10,5 kDa, en el que los primeros 19 residuos corresponden a una secuencia péptido señal hidrófuga, que es cortada durante la secreción de la proteína madura de 8,5 kDa (Zehentner BK, Carter D. 2004).

En el tejido mamario, la MGA se encuentra glucosilada y unida covalentemente a la lipofilina B (MGA-LPB) de manera antiparalela (heterodímero), formando a su vez un heterotetrámero de 45 kDa mediante unión no covalente de 2 heterodímeros (*Carter D, et al. 2002*) (*Colpitts TL, et al. 2001*).

Estudios previos sugieren que la expresión de la MGA no estaría asociada con la lactancia sino con la proliferación de la glándula mamaria y la diferenciación terminal (*Watson MA, et al, 1998*). Sin embargo, hasta el día de hoy la función de la MGA sigue siendo desconocida (*Gargano G, et al. 2006*).

En un trabajo pionero, Watson y Fleming analizaron la expresión de MGA en 35 carcinomas mamarios usando RT-PCR y Northern blot. Se comunicó la sobreexpresión de MGA (al menos 10 veces respecto del tejido normal) en el 23% de los tumores estudiados (*Watson MA, Fleming TP. 1996*). Sin embargo, raramente se encuentra MGA en tejido tumoral no mamario (*Houghton RL, et al. 2001*) (*O'Brien N, et al. 2002*).

Al examinar la expresión del ARNm de MGA en tejidos adultos y fetales de humanos, entre ellos mama, pulmón, glándula salival, útero, próstata, ovario, testículo y placenta, y en leucocitos de sangre periférica, ganglios linfáticos y médula ósea, determinaron que la expresión de MGA estaba restringida a la glándula mamaria adulta (*Watson MA, Fleming TP. 1996*) (*Fleming TP, Watson MA. 2000*).

Corradini y cols. (*Corradini P, et al. 2001*) estudiaron una serie de marcadores tumorales y concluyeron que la MGA y la maspina eran los únicos específicos para cáncer de mama, expresándose en un 97 y un 80% de las muestras de tejido con carcinoma mamario, respectivamente. A diferencia de las citoqueratinas 19 y 20, del receptor del EGF-R, del CA 15.3 y del antígeno carcinoembriogénico, la MGA y la

maspina no se expresaron en ninguna muestra de sangre periférica ni en células progenitoras de sangre periférica o de médula ósea de donantes sanos, ni en muestras de tumores hemáticos, muestras de sangre o células progenitoras de sangre periférica de pacientes con tumores hemáticos o tumores sólidos diferentes del carcinoma mamario.

O'Brien y cols. (*O'Brien N, et al. 2002*) compararon la expresión de 3 miembros de la familia de SCGB humanas (MGA, mamaglobina B y lipofilina B) en tejidos de mama no malignos, fibroadenomas y carcinomas mamarios. La MGA mostró ser el marcador más específico de los 3 para el cáncer de mama.

Se realizó un estudio (*Talantov D, et al. 2006*) de los perfiles de expresión en tejidos tumorales de varios marcadores moleculares, con el fin de determinar los más adecuados para identificar el origen de los sitios primarios de carcinomas metastásicos de diferentes órganos. La MGA y el factor de transcripción Ets derivado de la próstata fueron los únicos que mostraron alta especificidad para detectar metástasis provenientes del cáncer de mama.

En otros estudios (*Suchy B, et al. 2000*) (*Zafrazas M, et al. 2006*) (*Grünewald K, et al. 2002*) (*Fiegl M, et al. 2004*) (*Sasaki E, et al. 2007*) la MGA se ha detectado también en tejidos normales y malignos del tracto genital femenino (cérvix, útero y ovario) y en efusiones malignas ginecológicas. Sin embargo, Grünewald y cols. (*Grünewald K, et al. 2002*) encontraron una expresión de MGA significativamente mayor en tejidos de mama respecto de tejidos de ovario y de endometrio. Se comunicó también la expresión de MGA en tejidos normales y tumores de las glándulas sudoríparas (*Sjödin A, et al. 2003*) y salivales (*Sasaki E, Tsunoda N, et al.*), y raramente y en bajo grado de expresión en otros tejidos (*Zafrazas M, et al. 2006*).

Existen trabajos que se centran en el estudio de la proteína MGA, en lugar de centrarse en la expresión del ARNm (*Watson MA, et al. 1999*) (*Han JH, et al. 2003*). De ellos se concluye que la proteína MGA aparece en dos formas, una de alto peso molecular y otra de bajo peso molecular, en tejido mamario. La de alto peso molecular, de unos 25 kDa., parece ser un complejo MGA-LPB completamente glicosilado. La forma que cuenta con una masa de 18 kDa. corresponde a un complejo MGA-LPB parcialmente glicosilado (*Carter D, et al. 2002*). El porcentaje de cáncer de mama positivos para la forma de MGA de mayor peso molecular alcanza valores del 72% (*O'Brien NA, et al. 2005*). Se ha realizado además una comparativa entre la expresión de MGA mediante niveles de ARNm y niveles de la proteína. Se encontró concordancia en el 72% de los cánceres de mama cuando la expresión de mRNA se midió con RT-PCR convencional. Este nivel ascendió al 85% cuando se confirmó el resultado por RT-PCR a tiempo real en los que habían tenido resultado negativo por RT-PCR convencional (*O'Brien NA, et al. 2005*).

Se ha comprobado una correlación de la MGA de alto peso molecular con bajo grado tumoral, baja tasa de proliferación y receptores de estrógenos y progesterona positivos, lo cual sugiere que la presencia de MGA en cáncer de mama podría estar asociada a buen pronóstico (*Guan XF, et al. 2003*). Además otros estudios muestran que niveles altos de ARNm de MGA en tumores de mama están independientemente asociados con una mayor SLE (*Span PN, et al. 2004*). Por todo esto la MGA tiene el potencial de ser tanto un marcador de pronóstico como un marcador predictivo para el cáncer de mama.

Diversos estudios demuestran que es precisa la determinación por RT-PCR de genes complementarios a la mamaglobina debido a la gran heterogeneidad del cáncer de

mama. Zehenter y cols. (*Zehentner BK, et al. 2002*) han estudiado otros genes con este fin y concluyen que el empleo de múltiples marcadores produce un incremento en la sensibilidad diagnóstica y pronóstico en el cáncer de mama.

VII.B.11. Citoqueratina 19

La citoqueratina 19 (CK19) es una proteína de 40 kDa que, en humanos, está codificada por el gen KRT19 (*Schweizer J, et al. 2006*). Pertenece a la familia de las Queratinas. Las queratinas de tipo I se codifican en la región cromosómica 17q12-q21 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y son proteínas filamentosas intermedias responsables de la integridad estructural de las células epiteliales.

Las células de todos los mamíferos contienen un citoesqueleto intracitoplasmático complejo compuesto de tres unidades estructurales principales y varias proteínas asociadas: microfilamentos con actina, microtúbulos con tubulina y filamentos intermedios (FIs). Hay seis tipos distintos de FIs; los filamentos de queratina constituyen los FIs del tipo I y el tipo II. En comparación con los otros tipos de FIs, como actina o vimentina, las queratinas son las más complejas. Se han establecido un total de 20 subunidades diferentes en cualquier especie de mamífero con pesos moleculares que varían dentro del rango de 40 - 70 kDa. (*Moll R, et al. 1982*).

Las queratinas se pueden clasificar en formas moleculares altas y bajas atendiendo a su peso molecular, en formas ácidas o básicas atendiendo a su punto isoeléctrico. En general la mayoría de las queratinas de bajo peso molecular formarán pareja con una queratina de alto peso molecular específica. Del mismo modo, la mayoría de las queratinas básicas se unirán a queratinas ácidas según esté establecido por coexpresión. No todas las queratinas se sintetizan simultáneamente por una única célula, sino que diferentes subconjuntos de queratinas se expresan durante el proceso de

diferenciación terminal, en diferentes estados de desarrollo, así como en distintos epitelios. Gracias a esto, todos los epitelios (simples o complejos) se pueden clasificar basándose en la expresión de las proteínas: citoqueratinas (CK). Cuando un epitelio comienza una transformación maligna su perfil de queratinas normalmente se mantiene constante. Teniendo en cuenta que la expresión de queratina varía de forma importante de unos epitelios a otros, esta expresión se viene utilizando ampliamente para determinar la huella genética de varios carcinomas.

En mamíferos ocurre que muchos genes se presentan en múltiples familias, las cuales han evolucionado a través de múltiples rondas de duplicación génica, cuyos miembros individuales se expresan de forma diferenciada en relación con distintas rutas de diferenciación celular y desarrollo de órganos. Los genes que codifican las queratinas representan una de estas grandes familias multigénicas, que comprende al menos 30 genes que codifican polipéptidos de queratina.

Las queratinas de los tipos I y II generalmente tienen 9 exones y 8 intrones. (*Krauss S, Franke WW. 1990*). El número y posición de los intrones están normalmente bien preservados. (*Osborn M, Weber K. 1986*). No pasa lo mismo con la secuencia de los intrones ni con su longitud. La localización de los intrones en los genes de queratinas varía escasamente. Las más pequeñas y ácidas queratinas de tipo I (K9 - K20) se encuentran codificadas en el cromosoma 17q, mientras que las queratinas de tipo II, más grandes y básicas, se codifican en el cromosoma 12q (*Osborn M, Weber K. 1986*) (*Bader BL, et al. 1988*) (*Popescu NC, et al. 1989*) (*Romano V, et al. 1988*) (*Rosenberg M, et al. 1991*). Los ADNs de los miembros de la subfamilia pueden hibridar de forma cruzada unos con otros (*Klinge E, et al. 1987*).

Se han establecido ciertos principios por los que se produce la expresión de los genes de las queratinas. Uno de ellos es que al menos un miembro de cada subfamilia siempre se coexpresa en un tejido epitelial dado (*Steinert PM, Roop DR. 1988*). La expresión de los genes de queratinas está regulada a través del desarrollo. No se expresan universalmente durante el desarrollo embrionario, sino que diferentes estados de desarrollo de la célula epitelial durante la embriogénesis, expresan diferentes conjuntos de queratinas.

Existe poca información acerca de los factores que regulan la expresión de los genes de queratinas, aunque algunos factores se han relacionado con esta regulación, como es el entorno celular (*Kopan R, et al. 1987*).

Los filamentos de queratina contienen al menos un miembro de la subfamilia del tipo I y un miembro de la subfamilia del tipo II. Parejas de queratinas parecen estar coexpresadas consistentemente en distintos tipos de células epiteliales, de forma que ciertas parejas de queratinas se encuentran únicamente en epitelios simples (Tipo I: K18 y K19 y Tipo II: K8), mientras que otras se encuentran en epitelios estratificados (Tipo I: K14 y Tipo II: K4) (*Sun TT, et al. 1983*)

En el citoesqueleto de tejidos epiteliales se encuentran complejos patrones de polipéptidos de queratina (*Moll R, et al. 1982*), cuyo peso molecular varía entre aproximadamente 40.000 y 68.000 Da (*Sun TT, Green H. 1978*). Los dos grupos de keratinas mantienen los mismos rangos de tamaño dentro de sus respectivas subfamilias. El miembro básico de cada pareja de queratinas es siempre más grande que el miembro ácido por aproximadamente unos 8 kDa. Esta naturaleza dual tiene importancia funcional ya que los filamentos de queratina son heteropolímeros obligados constituidos por cadenas del tipo I y del tipo II en un rango molar 1:1 (*Steinert PM, et*

al. 1976) (*Franke WW, et al. 1983*). Todas las cadenas de las proteínas de queratinas tienen un esquema estructural común, que consiste en un dominio central rico en α -hélice rodeado de dominios no- α -hélice N- y C- terminales de tamaños variables. La región α -hélice de la queratina humana contiene de 310 a 350 aminoácidos, flanqueados por dominios no helicoidales tanto en las cabezas como en las colas, cuya longitud y composición varían de forma importante (*Steinert PM, et al. 1985*).

El dominio α -hélice alcanza los 47 nm y está compuesto por cuatro segmentos que contienen un patrón repetido de siete residuos (a-b-c-d-e-f-g)_n en el que las posiciones a y d son principalmente residuos hidrofóbicos, y una distribución periódica de residuos cargados con alternancia de cargas positivas y negativas (*Maddox P, et al. 1999*). Debido a las repeticiones de estos heptámeros y a los resultantes residuos polares en el perímetro de la hélice, las queratinas forman espontáneamente dímeros enrollados (*McLachlan AD. 1978*). Datos químicos, biofísicos y de microscopía electrónica concluyen que las cadenas monoméricas se asocian en paralelo y axialmente para formar un dímero de 40-50nm en forma de barra. Dos dímeros se asocian de manera antiparalela para constituir el tetrámero de queratina (*Geisler N, et al. 1992*). Estos filamentos se organizan en una red compleja supra-molecular que se extiende desde la superficie del núcleo hasta la parte más periférica de la célula, y el origen y el mantenimiento de esa red implica numerosas proteínas accesorias.

Como ya se ha mencionado, los dominios centrales de cada pareja de queratinas son importantes a la hora de definir los alineamientos moleculares en la estructura de la queratina. La disposición precisa y el papel de las secuencias de los dominios terminales no están claros.

Existe una gran similitud de aminoácidos en el dominio α -hélice entre las secuencias de las queratinas tipo I y tipo II. Entre las queratinas del primer tipo el dominio α -hélice comparte el 50-90% de similitud en las secuencias, mientras que las queratinas del segundo tipo tienen aproximadamente una homología del 30% en estas regiones (*Hanukoglu I, Fuchs E. 1982*). Sin embargo, los dominios no- α -hélice son distintos entre las diferentes queratinas y, por ello, son los lógicos candidatos para especificar las diferentes propiedades y funciones de los variados heterodímeros de los tipos I y II en los tejidos epiteliales.

El citoesqueleto se compone en su mayoría de queratinas y estructuras asociadas. Generalmente se forman redes interconectadas complejas, que surgen de un anillo perinuclear, desde el que las queratinas parecen conectar con la superficie nuclear y extenderse a través del citoplasma, terminando en la membrana plasmática. Esta asociación entre la membrana plasmática y la superficie nuclear parece proveer de un enlace continuo que puede tener implicaciones importantes para la organización del citoplasma, la comunicación celular, y quizá transporte de información hacia y desde el núcleo. Aunque las queratinas son entidades relativamente estáticas que sirven de mero soporte para el núcleo y que provee a la célula de fuerza de tensión, las redes de queratina son estructuras altamente dinámicas también. En la mitosis y en el periodo postmitótico las queratinas sufren rápidos intercambios de grupos fosfato. Las queratinas se despolimerizan en oligómeros pequeños y solubles que salen en un rápido equilibrio con las redes de queratinas. Las queratinas citoplasmáticas cambian constantemente su longitud en respuesta a las diferentes fases del ciclo celular, movimiento celular y diferenciación (*Steinert PM, Liem RK. 1990*).

Las células epiteliales poseen uniones denominadas desmosomas que representan una compleja región de adhesión célula a célula. Las queratinas forman una red compleja que cursa a través del citoplasma, que parece originarse de una caja perinuclear y que sustenta el desmosoma, por lo que integra mecánicamente las células adyacentes del epitelio.

Al estudiar la expresión de queratinas en neoplasias humanas vemos que existen áreas en las que la aplicación diagnóstica del tipado de queratinas puede ser de gran valor, como en la determinación del tipo tumoral en casos de tumores morfológicamente no diferenciados, así como en la identificación del origen de un tumor metastásico del que se desconoce la localización primaria. La correcta identificación en esos casos es particularmente importante a la hora de decidirse por los protocolos terapéuticos específicos de tumor que se usan actualmente (*Moll R. 1998*).

Los patrones de expresión de queratinas en carcinomas de epitelios estratificados y de epitelios simples son diferentes. En general los carcinomas con origen en epitelios simples son positivos para K7 y/o K20, y negativos para K14 y K5/6; mientras que los carcinomas con origen en epitelios estratificados son positivos para K14 y K5/6 y negativos para K7 y/o K20. En varios epitelios simples, incluyendo el mesotelio y sus neoplasias, puede encontrarse la K19. Esta queratina está ausente en algunos epitelios simples como hepatocitos, la mayoría de los túbulos renales y folículos tiroideos (*Fonseca E, et al. 1997*) (*Cheung CC, et al. 2001*). Más de la mitad de los casos de carcinoma de células renales son positivos para K19.

Ya en tejido mamario, las células luminales en glándula mamaria normal en reposo normalmente expresan K7, K8, K18 y K19, pero no K20. Los distintos patrones de expresión son de utilidad para distinguir entre un adenocarcinoma primario de mama

y un adenocarcinoma que proviene de otro sitio primario (*Tot T. 1999*). También es posible diferenciar entre un carcinoma ductal de uno lobulillar. En los adenocarcinomas poco diferenciados se muestran perfiles de queratinas similares a los carcinomas derivados de epitelio estratificado (*Otterbach F, et al. 2000*) (*Malzahn K, et al. 1998*). Estos carcinomas se asocian a un peor pronóstico (*Malzahn K, et al. 1998*), de ahí la importancia de su correcta identificación.

K19 es la queratina de menor peso molecular y que da lugar a la proteína utilizada en nuestro estudio como marcador de célula de origen epitelial: la citoqueratina 19 (CK19). Como ya se ha descrito, es una proteína de 40 kDa que pertenece a la familia de las Queratinas, que son proteínas filamentosas intermedias responsables de la integridad estructural de las células epiteliales.

La CK19 es una queratina de tipo I, las cuales consisten en proteínas ácidas que se organizan en parejas de cadenas de queratina heterotípicas. Esta citoqueratina ácida se encuentra específicamente en la capa superficial de transición que envuelve la epidermis en desarrollo.

En diversos estudios se ha comprobado la alta especificidad (94%) y sensibilidad (86%) que se logra mediante este marcador (*Backus J, et al. 2005*), por lo que la CK19 es el marcador más usado para la detección de células tumorales diseminadas mediante RT-PCR en ganglios linfáticos, sangre periférica y médula ósea de pacientes con cáncer de mama, tanto operable como metastásico (*Brown NM, et al. 2006*).

Además existen datos que confirman que utilizando la combinación de los dos marcadores empleados en nuestro estudio: CK19 y MG, se alcanza un mayor porcentaje de sensibilidad (90%) al mismo nivel de especificidad (94%) (*Backus J, et al. 2005*).

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 ADN tumoral o de los ADN complementarios de los ARN mensajeros tumorales, serán las bases de los estudios en el cáncer de mama. Pero mientras esto llega, el papel de los factores pronóstico clásicos sigue siendo crucial para la clasificación y el manejo terapéutico de las pacientes con cáncer de mama.

OBJETIVOS

1. Determinar la frecuencia de la mamaglobina y la citoqueratina 19 mediante RT-PCR convencional en el ganglio centinela extraído intraoperatoriamente de mujeres operadas de cáncer de mama en estadios I y II.
2. Determinar la frecuencia de la mamaglobina y la citoqueratina 19 mediante RT-PCR a tiempo real en el ganglio centinela extraído intraoperatoriamente de mujeres operadas de cáncer de mama en estadios I y II.
3. Comparación de las frecuencias de mamaglobina y citoqueratina 19 obtenidas mediante RT-PCR convencional y RT-PCR a tiempo real.
4. Valorar la sensibilidad, especificidad, el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo de la técnica RT-PCR para el ganglio centinela.
5. Estudiar la relación entre los marcadores genéticos estudiados, mamaglobina y citoqueratina19, y los factores pronóstico clásicos del cáncer de mama.
6. Determinar el valor pronóstico de estas alteraciones genéticas en relación con la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad.
7. Analizar si el estudio del ganglio centinela mediante RT-PCR presenta valor pronóstico independiente.

PACIENTES Y MÉTODO

I. PACIENTES

I.A. Periodo del Estudio

Este trabajo ha sido realizado durante el periodo de tiempo comprendido entre marzo de 2004 y agosto de 2015 en el seno de un equipo multidisciplinario dedicado a la atención de pacientes diagnosticados de patología mamaria, con la colaboración de los servicios de Análisis Clínicos (Genómica), Obstetricia y Ginecología (Patología de la mama), Medicina Nuclear y Anatomía Patológica del Hospital Clínico San Carlos de Madrid. Las pacientes fueron intervenidas quirúrgicamente durante el periodo comprendido entre marzo de 2004 y marzo de 2010.

I.B. Población del Estudio

Se trata de un estudio de cohortes prospectivo. Se incluyeron en el estudio 350 pacientes diagnosticadas de cáncer de mama en el Servicio de Ginecología del HCSC, en estadios iniciales (tamaño del tumor primario ≤ 3 cm) y sin afectación axilar tras la exploración clínica y ecográfica de la axila (T1N0-T2N0 clínico). Todas las pacientes eran de sexo femenino.

De esas 350 pacientes se excluyeron aquellas que presentaban un tratamiento prequirúrgico, aquellas a las que se les había realizado la técnica del ganglio centinela intraoperatorio y que se les hizo linfadenectomía por cambios de protocolo en el hospital (33 pacientes). Se descartaron también las cirugías profilácticas, las pacientes con tumor benigno, o que no tuvieron tumor (5 pacientes). También se descartaron las pacientes en las que no se encontró ningún resultado mediante las técnicas histológicas (1 paciente) y aquellos casos en los que las PCR no revelaron ningún resultado (3 pacientes). Además quedaron fuera del estudio aquellas pacientes de las que no se pudo

obtener muestra durante la cirugía (1 paciente) o que, aún teniendo muestra, no se pudo aislar el ARN (5 pacientes).

Con todo lo anterior, podemos trabajar con un tamaño muestral definitivo de 302 pacientes (Tabla VIII).

Tabla VIII. Pacientes excluidas de la población inicial y tamaño muestral definitivo del estudio.

Población inicial	350
Tratamientos prequirúrgicos Ganglio centinela + linfadenectomía	33
Cirugías profilácticas Tumor benigno No tumor	5
Sin resultado por histología	1
Sin resultado por PCRs	3
Sin muestra de tejido disponible	1
Imposible recuperación de RNA	5
Tamaño muestral definitivo:	302

La población del estudio quedó constituida finalmente por 302 pacientes de cáncer de mama en estadios I y II, candidatas a la técnica del ganglio centinela.

Sus ganglios fueron evaluados, por el servicio de Anatomía Patológica, de forma intraoperatoria con H&E, realizando improntas citológicas y/o biopsia por congelación. También se les realizó la técnica de inmunohistoquímica para citoqueratina AE1-AE3 según los protocolos establecidos.

En el laboratorio de Genómica se realizó la determinación de los marcadores genéticos MG y CK19 en las 302 pacientes.

Ninguna de las pacientes había recibido tratamiento neoadyuvante.

Se obtuvo el consentimiento informado de las pacientes previo a la investigación (Anexo 1).

Este estudio fue valorado favorablemente por el comité de ética e investigación clínica del hospital (Anexo 2)

Quedaron excluidas las pacientes en las que la técnica del ganglio centinela no pudo realizarse, bien por fallo de la sonda portátil o por la presencia de más de cinco ganglios centinela, no incluyéndose dentro de las 350 pacientes iniciales.

Se incluyeron las pacientes que fueron sometidas a la técnica del ganglio centinela en el Hospital Clínico San Carlos (HCSC) de Madrid, durante el periodo comprendido entre octubre de 2004 y marzo de 2010. Estas pacientes recibieron cirugía conservadora o radical y presentaron buena migración del marcador en la prueba de imagen realizada por Medicina Nuclear.

En la Tabla IX se enumeran los criterios de inclusión de este estudio.

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

Criterios de inclusión del estudio.	
1-	Pacientes con diagnóstico de cáncer de mama invasor o microinvasor.
2-	Pacientes diagnosticadas y tratadas en el HCSC de Madrid.
3-	Pacientes intervenidas dentro del periodo del estudio.
4-	Tamaño tumoral ≤ 3 cm. de diámetro.
5-	Ganglio linfático sin clínica patológica.
6-	Biopsia intraoperatoria del ganglio centinela con estudio de H&E.
7-	Migración satisfactoria del radioisótopo.
8-	Consentimiento informado autorizado.

II. METODO

II.A. Metodología Clínica

El estudio de este grupo de pacientes se llevó a cabo en tres etapas: etapa preoperatoria, etapa operatoria y etapa postoperatoria.

Etapa preoperatoria

En todas las pacientes se realizó una historia clínica detallada, estudios radiológicos y determinaciones analíticas básicas.

El día previo a la cirugía, el Servicio de medicina Nuclear realizó la inyección del isótopo radiactivo (Tecnecio 99m, Tc99m). Posteriormente, mediante linfogammagrafía, se comprobó la migración del coloide y se constató el número y la situación de los ganglios marcados en la axila.

Etapa operatoria

Se realizó el tratamiento quirúrgico indicado en cada caso, mastectomía conservadora o radical y posterior técnica del ganglio centinela, según protocolos establecidos en el HCSC.

Para la detección del ganglio centinela el Servicio de Medicina Nuclear acudió con una sonda gammadectora portátil a la cirugía. Con dicha sonda el cirujano localizó el ganglio centinela, comparando el conteo de este con el conteo en el lugar de los puntos de inyección del marcador y con el lecho quirúrgico.

Los ganglios centinela obtenidos fueron analizados intraoperatoriamente mediante tinción con hematoxilina-eosina. Con posterioridad a la cirugía se realizó

inmunohistoquímica en los casos oportunos y, se llevó a cabo la técnica de RT-PCR para la detección de los marcadores genéticos MG y CK19.

Solo en 69 pacientes se pudo realizar, además de lo anterior, la técnica de RT-PCR a tiempo real durante la intervención.

Se practicó una linfadenectomía axilar dentro del mismo proceso quirúrgico en aquellos casos en los que se detectó metástasis en la tinción de H&E.

Etapa postoperatoria

Con el objeto de analizar la posible influencia pronóstica de los marcadores genéticos determinados en las pacientes intervenidas de cáncer de mama, se realizó el seguimiento clínico a las mismas. A todas estas pacientes se les realizó el seguimiento clínico según el protocolo establecido en la Unidad de Patología Mamaria del HCSC.

Este protocolo contempla los antecedentes de enfermedad oncológica en la historia personal o familiar de la paciente, las características histológicas del tumor y las metástasis, la presencia de marcadores genéticos y moleculares, y los eventos de recidiva y muerte. Tabla X.

La mediana del tiempo de seguimiento fue de 72 meses, con un rango entre 52 y 76 meses.

Tabla X: variables clínicas consideradas en el estudio de la historia clínica de las pacientes.

VARIABLES CLÍNICAS:
• Edad
• Fecha de cirugía
• Número de ganglios centinela estudiados
• Tamaño de las metástasis en el ganglio centinela
• Linfadenectomía
• Número de ganglios positivos en la linfadenectomía.
• Tamaño del tumor
• Grado tumoral
• Tipo histológico del tumor
• Estadio según la clasificación TNM
• Presencia o ausencia de receptores hormonales de estrógenos
• Presencia o ausencia de receptores hormonales de progesterona
• Índice de proliferación Ki67
• Estudio del gen Her2neu
• Existencia de tratamiento posquirúrgico
• Ocurrencia o no de recidiva
• Fecha de recidiva
• Causa de la muerte
• Estado de vida o muerte en el momento de cierre del estudio
• Antecedentes obstétricos
• Antecedentes personales y familiares de cáncer de mama y/u otros tumores
• Antecedentes personales de patologías benignas

II.B. Metodología Analítica

Técnica de Biología Molecular

La determinación de los marcadores utilizados para el diagnóstico de micrometástasis en el ganglio centinela ha sido realizada en el laboratorio de Genómica del HCSC.

La técnica empleada ha sido la RT-PCR. Esta técnica es la combinación de la transcripción reversa (RT), que implica el paso de ARN a ADN, y de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), que conlleva la amplificación del ADN obtenido en la retrotranscripción.

Se han utilizado dos tecnologías:

- **RT-PCR convencional**
- **RT-PCR a tiempo real**

En el diagnóstico de las micrometástasis se han analizado dos marcadores, mamaglobina (MG) y citoqueratina 19 (CK19). La RT-PCR permite el análisis de estos marcadores en el tejido ganglionar. Estos marcadores se expresan en tejido de origen mamario y por tanto son indicadores de micrometástasis en el ganglio centinela.

Además de las interacciones que pueden producir las RNAsas ya mencionadas, existen una serie de sustancias que también pueden interferir en la técnica, como son:

- Si existe presencia de grasa se deberá recortar de las secciones del tejido que se vaya a emplear en el análisis, evitándose, de ese modo, resultados erróneos.
- La contaminación de la muestra con tejido mamario normal o tumoral primario puede dar un resultado falso positivo. Debido a esto es conveniente manipular la muestra con instrumental no utilizado previamente en la cirugía.

- Por el contrario, ni colorantes de rastreo ni el tecnecio 99 son sustancias que interfieran en la reacción de RT-PCR utilizada en nuestro centro.

Una vez extraído el ganglio centinela en el acto quirúrgico, se recogió una porción de la muestra para la realización del estudio biomolecular. Es necesaria la preservación del ganglio centinela en la solución estabilizadora de ARN (RNA later) que permite el traslado y conservación, en condiciones óptimas, hasta el laboratorio de Genómica.

Ya en el laboratorio de Genómica se extrajo el RNA manualmente, con el kit de extracción RNeasy Mini Kit (Qiagen), se comprobó la integridad del RNA mediante geles en condiciones desnaturalizantes y se determinó la positividad o negatividad de estos ganglios, según presencia o ausencia de MG y/o CK19, utilizando la técnica RT-PCR convencional.

Paralelamente, en 69 pacientes se realizó la determinación de estos marcadores de forma intraoperatoria, mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real. Esto se realizó gracias a la cesión de la tecnología necesaria por parte de la casa comercial (GeneSearchTM Breast Lymph Node, de Veridex).

En las pacientes en las que se realizó la determinación intraoperatoria mediante la RT-PCR a tiempo real, se obtuvo el resultado en unos 50 minutos.

II.B.1. Técnica RT-PCR convencional.

La técnica RT-PCR convencional conlleva cinco pasos bien definidos: la preservación del ganglio centinela en RNA later, la extracción adecuada del ARN, la valoración de la integridad del ARN en todos los casos, la RT-PCR de la CK19 y de la MG, y, por último, la realización de la electroforesis en un gel de poliacrilamida. Por

consiguiente, se trata de una técnica cuyo resultado no se va a obtener el mismo día de la intervención quirúrgica.

En el laboratorio de Genómica, con posterioridad a la intervención quirúrgica, se procedió a la extracción del ARN de los tejidos mediante el RNeasy Mini Kit (Qiagen). Las muestras ganglionares se homogenizaron en una mezcla de β mercaptoetanol y un tampón específico de lisis y tras varias etapas consecutivas de lavado y centrifugado, se aísla el ARN diluido en agua destilada. El ARN extraído se mantiene congelado a -80° C. El objetivo último es obtener entre 0,3 y 3 μ g de ARN total por cada miligramo de tejido de la muestra del ganglio centinela.

Después de haber extraído el ARN se confirmó su integridad. Para ello se corrió un gel de agarosa al 1% en condiciones desnaturizantes (gel de agarosa al 1% y formaldehído 12,3 M al 16%).

Posteriormente se procedió a teñir con bromuro de etidio y, por último, se expuso a radiación ultravioleta. Como resultado, se debían observar las bandas de las subunidades 28S y 18S del ARN ribosómico, lo cual confirmaría que el ARN a estudio poseía una adecuada integridad. Si no fuera de este modo, es decir el ARN se encontrara degradado, el resultado de la prueba no podría ser valorado.

Tras la comprobación de la integridad del ARN se llevó a cabo la RT-PCR para el análisis de la expresión de la CK19 y de la MG, de manera independiente. Ambos marcadores se analizaron empleando el kit OneStep RT-PCR (QIAGEN). En la RT-PCR de la CK19 y de la MG se emplean unos cebadores de ARN específicos. Tablas XI y XII.

Tabla XI. Cebadores empleados en la RT-PCR convencional para la CK19.

CK19	Secuencia de nucleótidos
<i>Cebador Sentido</i>	5' – AGA TGA GCA GGT CCG AGG TTA-3'
<i>Cebador AntiSentido</i>	5' – CCT GAT TCT GCC GCT CAC TAT CA-3'

Tabla XII. Cebadores empleados en la RT-PCR convencional para la MG.

MG	Secuencia de nucleótidos
<i>Cebador Sentido</i>	5' –CAA ACG GAT GAA ACT CTG AGC AAT GTT GA-3'
<i>Cebador AntiSentido</i>	5' – TCT GTG AGC CAA AGG TCT TGC AGA-3'

Se prepara la mezcla de reacción compuesta por diferentes reactivos, los cuales se muestran en la tabla XIII.

Tabla XIII. Mezcla de la reacción para el estudio de la MG y CK19, mediante el OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN). Cebador S: Cebador Sentido. Cebador AS: Cebador Antisentido.

	MAMAGLOBINA y CITOQUERATINA 19	
Componente	Volumen	Concentración Final
Agua sin RNasas	11 µl	--
Tampón 5x	5 µl	1x
dNTP Mix	1 µl	400 mM de cada dNTP
Cebador S	1 µl	0,6 µM
Cebador AS	1 µl	0,6 µM
Mezcla de enzimas	1 µl	--
ARN	5 µl	--
Volumen final:	25 µl	

La mezcla de enzimas que se empleó para realizar la reacción con el RNA contiene: la enzima retrotranscriptasa y la enzima Hotstar Taq polimerasa. A esto se adicionaron los dinucleótidos trifosfato (dNTPs), los cebadores específicos para cada marcador y tampón específico de cloruro magnésico, consiguiendo la mezcla de reacción.

Tras realizar una adecuada mezcla de reacción con el ARN del ganglio centinela a estudio, se procedió a la amplificación de dicho ARN mediante un termociclador, que somete la mezcla obtenida a diferentes ciclos de temperatura y tiempo (34 ciclos en total). Tabla XIV.

Tabla XIV. Ciclos del programa del termociclador para la amplificación del ARN de la CK19 y MG.

	CITOQUERATINA 19	MAMAGLOBINA
1 ciclo	50°C durante 30 minutos	50°C durante 30 minutos
1 ciclo	95°C durante 15 minutos	95°C durante 15 minutos
30 ciclos	94°C durante 30 segundos	94°C durante 30 segundos
	60°C durante 30 segundos	65°C durante 30 segundos
	72°C durante 1 minuto	72°C durante 1 minuto
1 ciclo	72°C durante 10 minutos	72°C durante 10 minutos
1 ciclo	4°C indefinido	4°C indefinido

La diferencia a la hora de realizar la amplificación del ADN para la CK19 y la MG es la temperatura de hibridación, que en el caso de la CK19 es de 60°C durante 30 segundos, mientras que la MG es de 65° C durante 30 segundos. Esta temperatura de hibridación es la que da la especificidad de la reacción.

A continuación, se procedió a realizar la electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%, empleándose 130 V durante 70 minutos. Posteriormente, el gel se sometió a tinción con un agente intercalante usado como marcador de ácidos nucleicos (bromuro de etidio, EtBr) y se sometió a la acción de luz ultravioleta con lo que se observó la migración de los amplificadores de ADN de cada paciente, en función del peso molecular, al igual que la migración del marcador del peso molecular (Figura 14 y 15). La positividad de la muestra a CK19 y MG será en todos aquellos casos en los que se observe una banda de peso molecular acorde al tamaño del amplificado: 105 pares de bases (pb) en la MG y 216 pb en la CK19.

En el caso de la PCR de la CK19 se amplifican dos productos, sólo uno de ellos es la CK19, lo cual se confirmó mediante secuenciación.

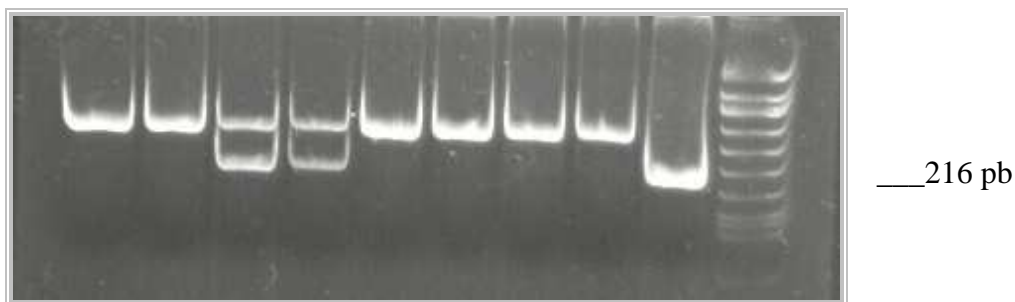


Figura 14. Migración tras electroforesis observada mediante luz ultravioleta del ADN amplificado para la CK19, de cada paciente, y del marcador del peso molecular. Resultando positivos los casos situados en posición: 3, 4 y 9.

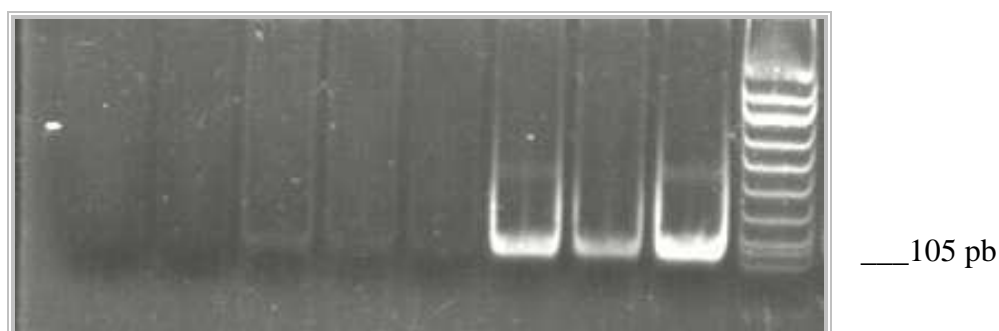


Figura 15. Migración tras electroforesis observada mediante luz ultravioleta del ADN amplificado para MG, de cada paciente, y del marcador del peso molecular. Resultando positivos para MG, los casos situados en posición: 6, 7 y 8.

II.B.2. Técnica RT-PCR a tiempo real

En el laboratorio de Genómica se llevó a cabo la técnica RT-PCR a tiempo real mediante el GeneSearch™ Breast Lymph Node (Veridex), durante el tiempo en el que esta tecnología nos fue cedida, la cual permite el estudio de la expresión del ARN de los marcadores: MG y CK19 para estudiar la posible presencia de micrometástasis. Este análisis emplea la RT-PCR a tiempo real para generar datos cuantitativos de expresión de los genes estudiados, que se expresan en un nivel alto en los tejidos de origen mamario, pero sólo en niveles de fondo en el tejido ganglionar linfático normal. Los resultados de la expresión se aplican contra criterios predeterminados para proporcionar un resultado cualitativo (positivo o negativo para micrometástasis), siendo datos objetivos no operador dependiente.

Para conseguir una mayor uniformidad de las muestras, los ganglios linfáticos se dividen en múltiples secciones (1,5 a 3 mm), y estos a su vez se alternan tanto para estudio histológico como para el estudio con RT-PCR.

Las secciones de tejido seleccionadas para estudio genético fueron sometidas a un proceso de homogenización del tejido ganglionar y posterior aislamiento del ARN para su inmediata utilización.

La RT-PCR a tiempo real fue realizada mediante el GeneSearch™ Breast Lymph Node, que emplea una reacción homogénea, de un paso y completamente controlada, incluyendo tres marcadores de genes: MG, CK19 y un gen de control interno o "Housekeeping gene", el porfobilinógeno desaminasa, (PBGD). A partir del ARN mensajero se forma una cadena complementaria de ADN por la acción de la retrotranscriptasa, una polimerasa termoestable del ADN. Posteriormente se lleva a cabo un proceso de amplificación obteniéndose secuencias de ADN bicatenarias (amplicones). A continuación, se realizan procesos de desnaturalización e hibridación/extensión aumentando el número de amplicones existentes, detectados gracias a sondas de ADN específicas de la secuencia. Esta RT-PCR a tiempo real, así como la interpretación de los resultados se llevó a cabo en el termociclador SmartCycler® (Cepheid), siguiendo las instrucciones del distribuidor.

Los marcadores génicos se detectan por medio de un aumento de la fluorescencia. El valor umbral del ciclo del marcador analizado se determina cuando la señal fluorescente sobrepasa un límite umbral predefinido. El número de ciclos necesarios para superar dicho umbral se denomina Ct (Threshold Cycle), es decir, el Ct es el ciclo en el que se produce un aumento significativo de la señal de fluorescencia asociada con un crecimiento exponencial del producto de PCR. Si al finalizar la reacción los controles externos incluidos en el kit de amplificación son válidos, entonces el valor génico de la muestra se compara con los valores umbrales de Ct, que

son específicos de cada marcador. Si el valor de uno o de ambos marcadores génicos es inferior al valor umbral, se determina que la muestra es positiva.

Los controles que han de ser incluidos en cada reacción son:

- Controles externos positivos: incluye ADNc de MG y CK19.
- Control interno negativo: contiene únicamente ADNc de PBGD

Los valores umbrales del ciclo para cada marcador se han determinado en las siguientes cifras:

- Mamaglobina: Ct menor o igual a 31.
- Citoqueratina 19: Ct menor o igual a 30.
- Control interno (PBGD): Ct menor de 36.

Según estos valores, los resultados serán interpretados de la siguiente manera:

- Si el valor de Ct de uno o ambos marcadores génicos es inferior al valor umbral y el control interno es inferior al valor umbral, se determina que la muestra es positiva.
- Si el valor de Ct de ambos marcadores génicos es superior al valor umbral y el control interno es inferior al valor umbral, se determina que la muestra es negativa.
- Si el valor de Ct del control interno es superior al valor umbral se determina que la muestra es no válida.
- Si los controles externos no son válidos se determina que todo el proceso de amplificación es no válido.

En la figura 16, se muestran imágenes de una ronda de RT-PCR a tiempo real en el SmartCycler®, en la que la reacción se ha producido correctamente y se detectan resultados positivos y negativos.

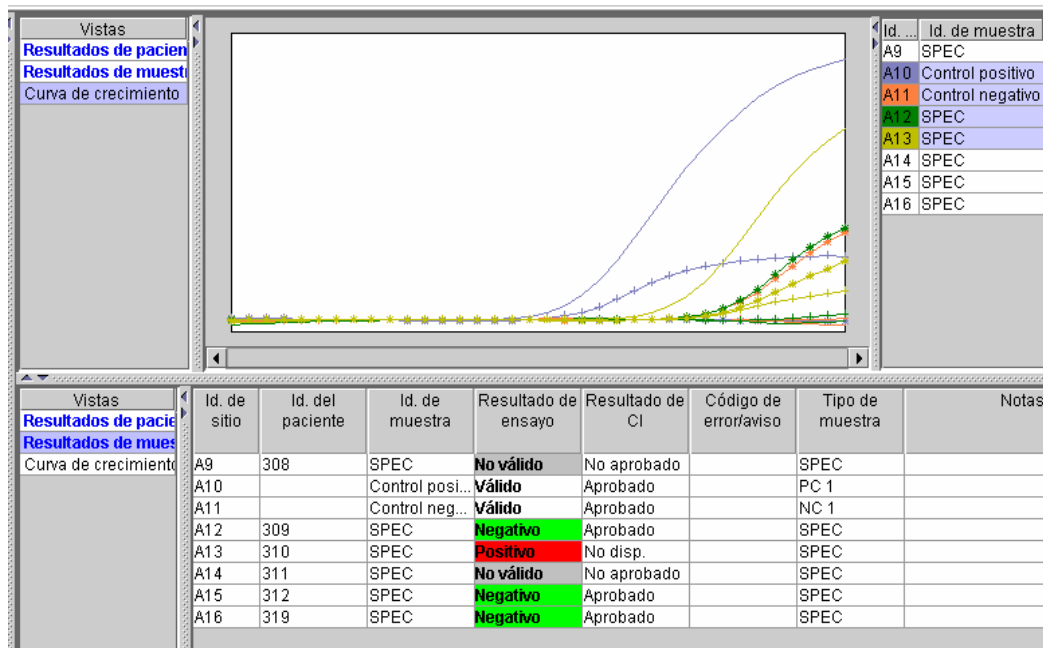


Figura 16: Resultados obtenidos en el SmartCycler®. Visión en conjunto del control positivo (Id. del sitio A10 – morado), control negativo (Id. del sitio A11 – naranja), paciente 309 (Id. de sitio A12 – verde oscuro) con resultado negativo y paciente 310 (Id. de sitio A13 – verde claro) con resultado positivo.

Es importante tener en cuenta que la contaminación de la muestra con tejido mamario (normal, benigno o maligno) o tejido ganglionar mamario de otro paciente puede aportar resultados erróneos, que los resultados del análisis pueden no ser informativos si la calidad y/o cantidad de la muestra ganglionar es insuficiente y que si el peso del tejido es inferior a 50 mg puede provocar un índice más alto de pruebas no válidas del análisis empleado.

La técnica de RT-PCR a tiempo real puede proporcionar un resultado positivo o negativo para micrometástasis en un tiempo aproximado de 50 minutos. Esto permite que la técnica sea realizada durante el mismo acto quirúrgico y cuyo resultado puede contribuir así en la toma de decisiones, en cuanto a practicar o no linfadenectomía.

II.C. Metodología Estadística

Las variables cualitativas se presentan con su distribución de frecuencias. Las variables cuantitativas se resumen en su media y desviación estándar (DE) junto a su intervalo de confianza al 95%.

Se evaluó la asociación entre variables cualitativas con el test de χ^2 y, en el caso de que un 25% o más de los esperados fueran menores de 5, por la prueba exacta de Fisher, o en el caso de muestra emparejada, test de McNemar.

La concordancia entre técnicas se estudió con el índice Kappa.

Se estimaron las funciones de supervivencia global (SG) y supervivencia libre de enfermedad (SLE), por el método de Kaplan-Meier, para los factores clínico-patológicos y los marcadores genéticos estudiados.

En el análisis de la SG se definieron como eventos las muertes producidas como consecuencia del tumor, censurándose los pacientes vivos y aquellos que fallecieron por otras causas. La SG fue calculada como el tiempo transcurrido entre la fecha de la cirugía y la de la muerte o la última revisión registrada.

En la SLE el evento fue definido como el diagnóstico de recidiva locorregional o recurrencia a distancia en los pacientes previamente libres de enfermedad. La SLE fue

calculada como el tiempo transcurrido entre la fecha de cirugía y la del diagnóstico de la primera recidiva.

La comparación de las funciones de supervivencia de los distintos subgrupos se realizó mediante el test exacto de Breslow. Este test consiste en comparar el número de eventos observados en cada uno de los subgrupos con el número de eventos esperados en el caso de que la distribución de la variable dependiente fuera la misma en todas las categorías (hipótesis nula).

Se realizó un análisis estratificado para estudiar la relación entre los marcadores genéticos estudiados y los eventos, con el fin de detectar confusión e interacción, por las variables clínicas.

Se ajustó un modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox, que permite identificar y evaluar la relación entre los marcadores genéticos estudiados y el tiempo de ocurrencia de la muerte y la recidiva.

Se evaluó la existencia de interacciones, introduciendo las variables independientes multiplicativas con pruebas de significación estadística y se mantienen en el modelo los términos de interacción estadísticamente significativos. Se presentan los “razones de tasas” ajustados junto a sus intervalos de confianza (IC) al 95%. La interpretación de los parámetros del modelo con signos positivos indica un aumento de la tasa instantánea de riesgo, es decir, un peor pronóstico del sujeto para un valor alto de la variable x . Un parámetro con signo negativo indica mejor pronóstico para un valor alto en la variable.

Los supuestos básicos que deben de cumplir los datos para poder aplicar dicho modelo son sobre todo de la parte paramétrica ya que la contribución de las diferentes variables explicativas en la predicción de la supervivencia, o más precisamente, de la

tasa instantánea de riesgo, es la misma en cualquier momento de tiempo de seguimiento. La parte no paramétrica del modelo no impone ningún supuesto sobre la forma de distribución de los tiempos de supervivencia. Se han comprobado los supuestos del modelo.

En todos los contrastes de hipótesis se rechazó la hipótesis nula con un error de tipo I o error α menor a 0,05.

El paquete informático utilizado para el análisis fue SPSS para Windows versión 15.0.

RESULTADOS

I. ESTUDIO DESCRIPTIVO DE LA POBLACIÓN

I.A. Tamaño muestral.

La población objeto de nuestro estudio se compone de un total de 302 pacientes tratadas en la Unidad de Patología de la Mama y diagnosticadas de cáncer de mama en estadios I y II. Estas pacientes eran candidatas a la técnica del ganglio centinela.

I.B. Edad.

La media de edad de la población fue de 57,23 años, con una desviación estándar de 12,153 y una mediana de 57 años (rango intercuartílico $P_{25}= 48$ y $P_{75}= 67$).

La paciente de menos edad incluida en el estudio tenía 25 años y la de más edad 84 años en el momento del diagnóstico (Figura 17).

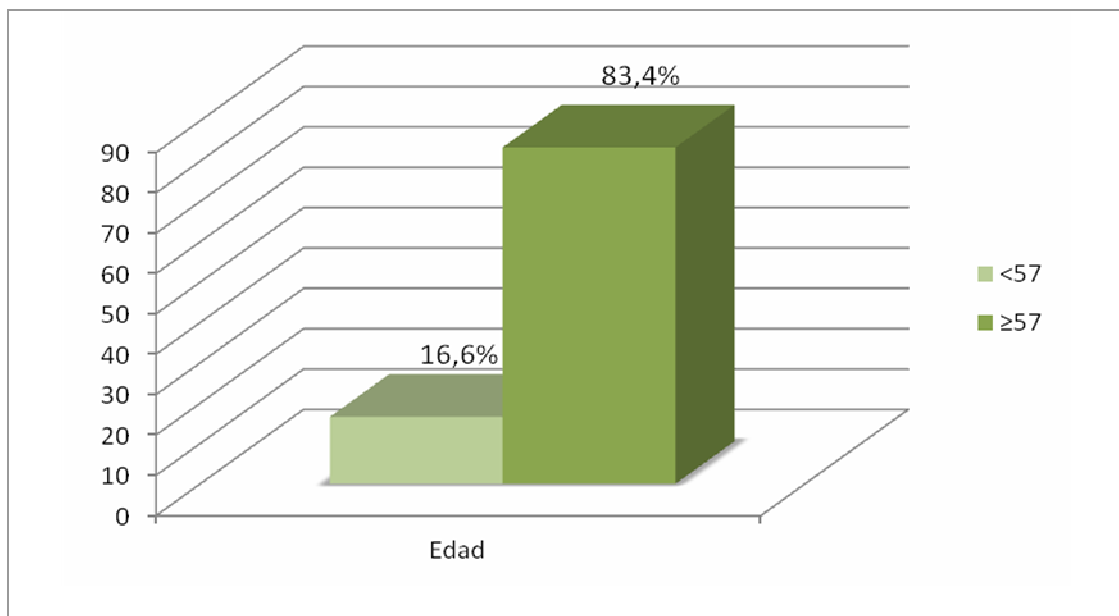


Figura 17: Distribución de la población en función de la media de edad.

I.C. Técnica de Hematoxilina y Eosina.

La técnica de H&E se realizó a las 302 pacientes. Se obtuvo resultado positivo en 47 casos (15,6%) y resultado negativo en 255 casos (84,4%) (Figura 18).

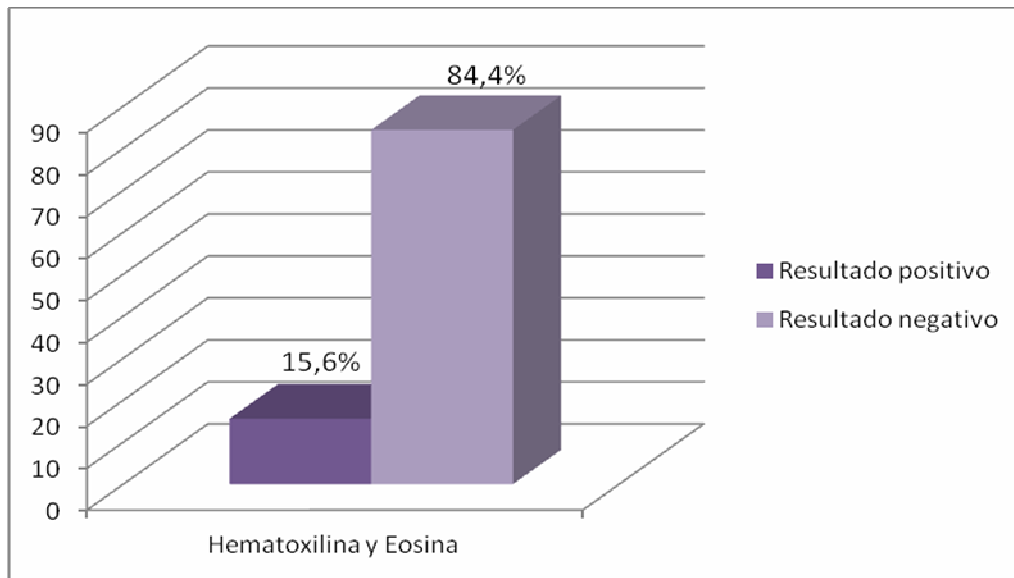


Figura 18: Resultados obtenidos para la técnica de Hematoxilina-Eosina.

I.D. Técnica Inmunohistoquímica.

La técnica IHQ no se realizó en 48 pacientes (15,9%), bien porque el resultado por H&E no daba lugar a dudas, o bien por falta de muestra suficiente.

En las 254 restantes (84,1%), se obtuvo resultado positivo en 11 casos (4,3%) y resultado negativo en 243 pacientes (95,7%) (Figura 19).

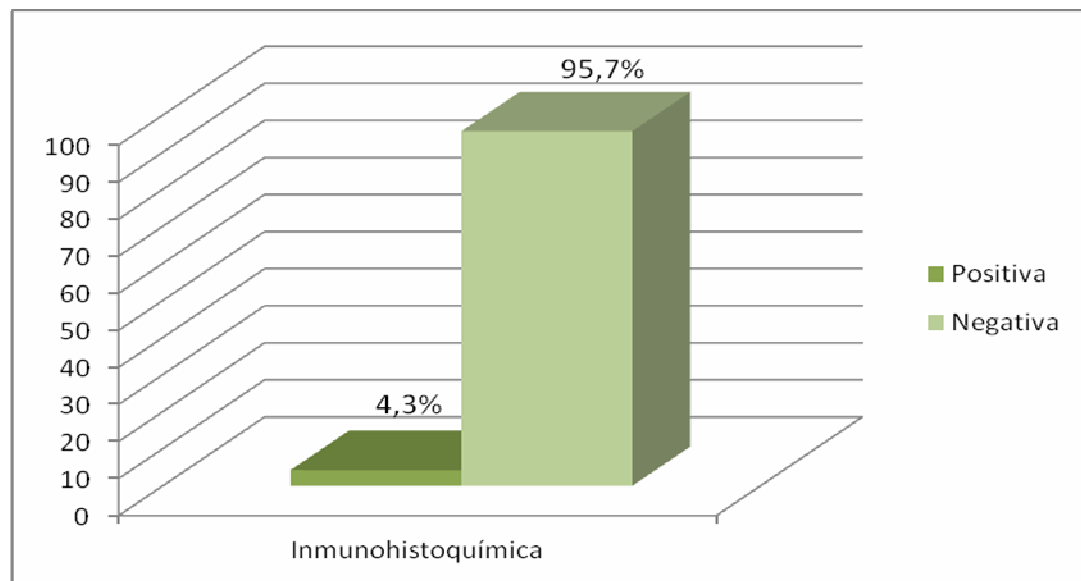


Figura 19: Resultados obtenidos de las 254 pacientes a la que se les realizó la técnica de IHQ.

I.E. Antecedentes genésicos

Uno de los factores demográficos recogidos en las historias clínicas fueron los antecedentes genésicos, clasificando a las pacientes en 2 grupos: por un lado, aquellas mujeres que no habían tenido ninguna gestación (G0P0): 64 pacientes (21,2%). Por otro lado todas aquellas que hubieran tenido uno o más gestaciones o partos: 238 pacientes (78,8%) (Tabla XV).

I.F. Antecedentes familiares

Se han tenido en consideración antecedentes familiares de enfermedades oncológicas en parientes de primer grado (madre, hermana o hija) que hayan desarrollado la enfermedad antes de los 50 años, ya que la mayoría de los casos se dan en mujeres en edades posteriores.

Presentaron antecedentes familiares de cáncer de mama 76 pacientes (25,2%). Presentaron antecedentes de algún otro tipo de cáncer 48 pacientes (15,9%). Las 178 pacientes restantes (58,9%) no presentaron antecedentes oncológicos en la familia (Tabla XV).

I.G. Antecedentes personales de patología benigna

Se incluyeron 268 pacientes (88,8%) con una historia clínica libre de eventos benignos previos. Se incluyeron también 17 pacientes (5,6%) que refirieron algún tipo de evento benigno en las mamas y otras 17 pacientes (5,6%) que refirieron algún tipo de evento benigno en otras localizaciones (Tabla XV).

Tabla XV: Estudio descriptivo. Antecedentes genésicos, antecedentes familiares de cáncer y personales de patologías mamarias benignas.

		N (302)	%
Antecedentes genésicos.	G0P0	64	21,2
	Otros	238	78,8
Antecedentes familiares de cáncer.	Mama	76	25,2
	Otros	48	15,9
	No	178	58,9
Antecedentes personales de patología mamaria benigna.	Mama	17	5,6
	Otros	17	5,6
	No	268	88,8

I.H. Afectación ganglionar

Durante la cirugía a la que las pacientes fueron sometidas se comprobó la existencia o no de afectación ganglionar. Se constató la afectación ganglionar en 48

pacientes (15,9%), estando libres de afectación ganglionar las 254 pacientes restantes (84,1%). Figura 20.

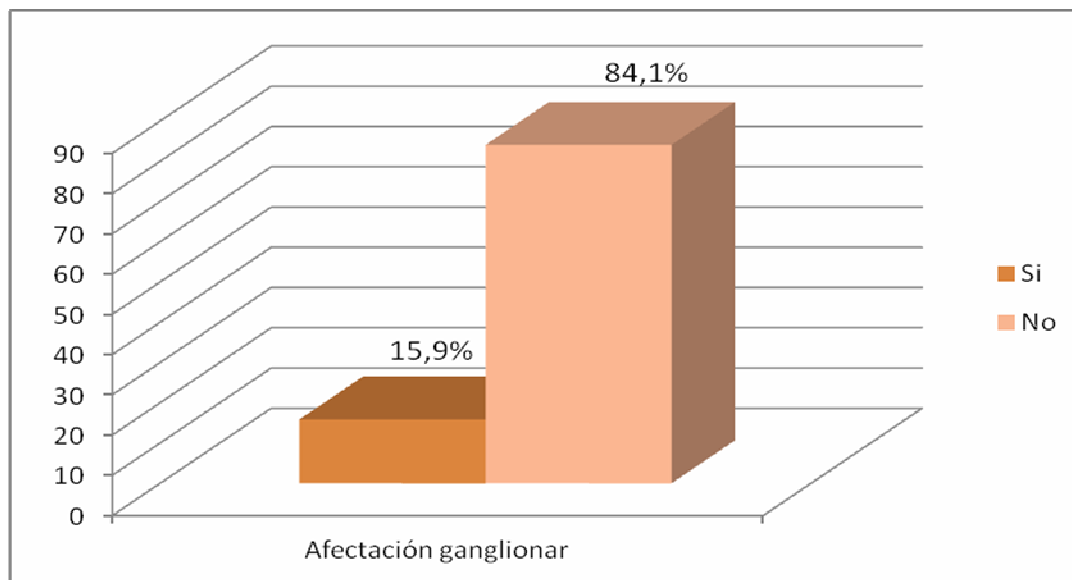


Figura 20: Hallazgo o no de afectación en los ganglios.

I.I. Número de ganglios centinela detectados

De las 302 pacientes, en 108 (35,8%) se detectó y extirpó un solo ganglio centinela. En 129 pacientes (42,7%) se detectaron dos. En las 65 pacientes restantes (21,5%) se contabilizaron tres o más ganglios centinela (Figura 21).

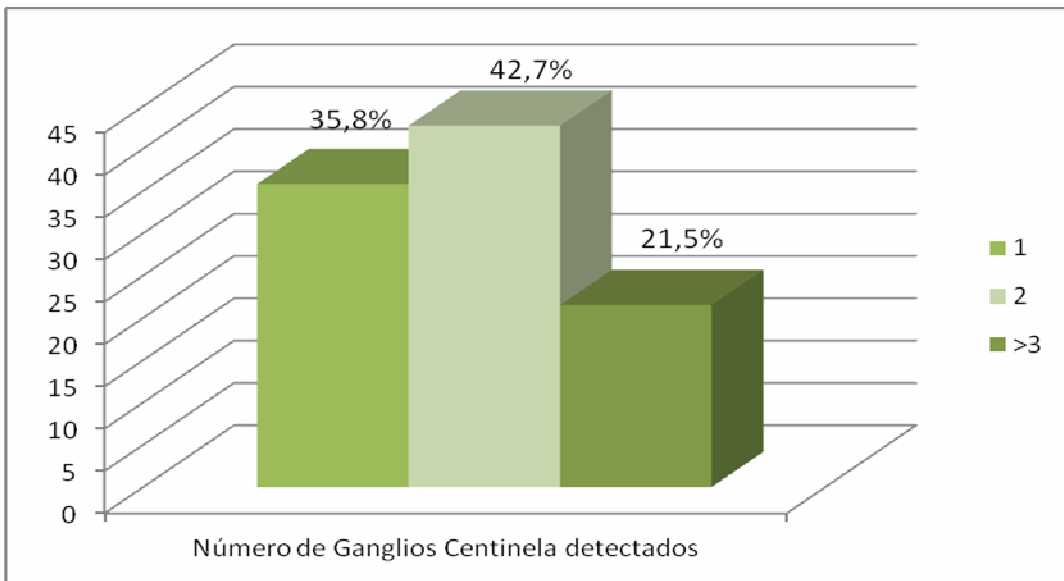


Figura 21: Número de Ganglios Centinela detectados.

I.J. Tamaño de la metástasis ganglionar

Se determinó la medida que alcanzaban las metástasis presentes en los ganglios. En 38 pacientes (64,4%) las metástasis encontradas fueron menores o iguales a 2mm. En 18 pacientes (30,5%) las metástasis alcanzaron un tamaño superior a 2,1mm. En 3 pacientes (5,1%) se encontraron células tumorales aisladas (CTA). En 243 pacientes no se encontró metástasis (Figura 22).

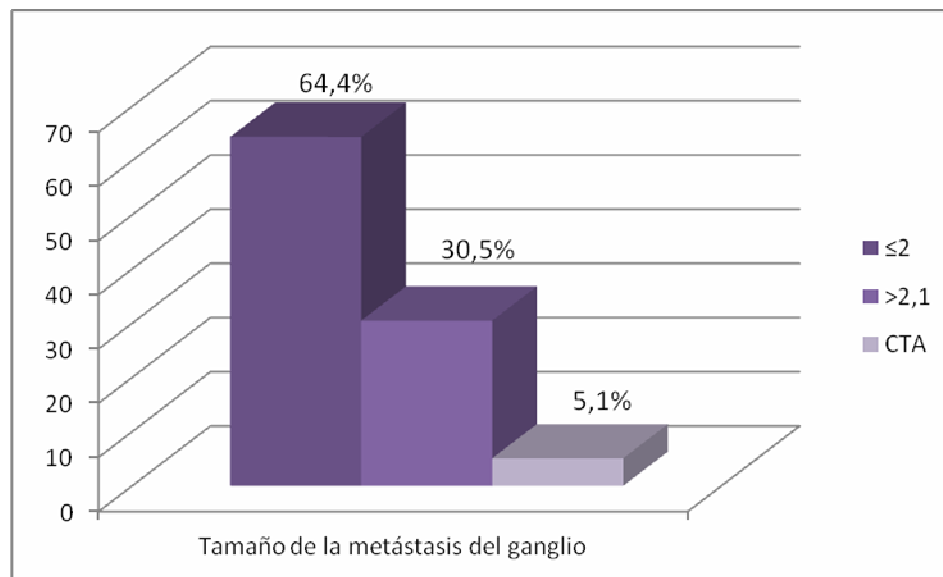


Figura 22: Tamaño de la metástasis encontrada en el ganglio.

I.K. Linfadenectomía

Se practicó linfadenectomía (LFD) en aquellas pacientes en las que la biopsia de ganglio centinela resultó positiva mediante la técnica de H&E, 59 pacientes (19,5%). En aquellas pacientes cuyas biopsias de ganglio centinela resultaron negativas, 243 pacientes (80,5%), no se realizó LFD.

I.L. Número de ganglios extraídos en la linfadenectomía

A 243 pacientes (80,5%) se les determinó una BGC negativa, por lo que no se les extrajo ningún ganglio adicional.

A 17 pacientes (5,6%) se les extrajeron entre 4 y 9 ganglios. A 39 pacientes (12,9%) se les extirparon entre 10 y 15 ganglios. Hubo 3 pacientes (1%) a las que se les extrajeron entre 16 y 20 (Figura 23).

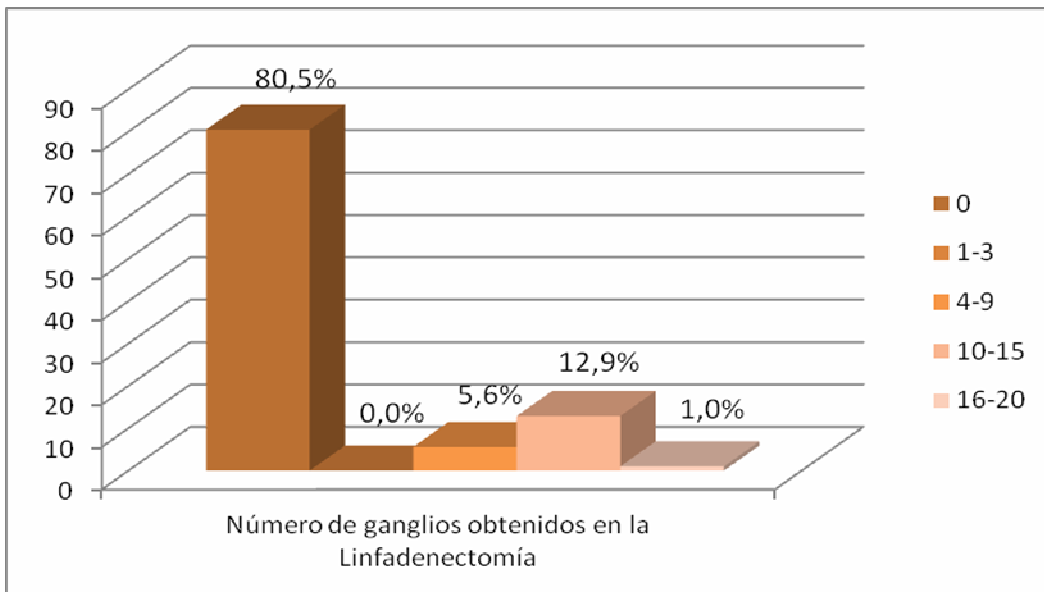


Figura 23: Número de ganglios extraídos en la linfadenectomía.

I.M. Número de ganglios positivos en la linfadenectomía

Tras realizar la LFD en las 59 mujeres, se procedió al estudio de los ganglios obtenidos mediante las técnicas de anatomía patológica.

En 37 pacientes (62,7%) estos ganglios no mostraron metástasis. En 19 pacientes (32,2%) se encontraron entre 1 y 3 ganglios positivos. En 2 pacientes (3,4%) se obtuvieron entre 4 y 6 ganglios positivos. En 1 paciente (1,7%) no fue posible obtener un resultado válido por falta de tejido suficiente.

I.N. Tamaño del tumor primario

En cuanto al tamaño del tumor primario, 251 pacientes (83,1%) presentaron un tumor de entre 0,1 y 2 cm. Encontramos 44 (14,6%) pacientes con un tamaño de tumor entre 2,1 y 3 cm. Hubo 7 pacientes (2,3%) en las que no se encontró este dato en la historia clínica. (Figura 24).

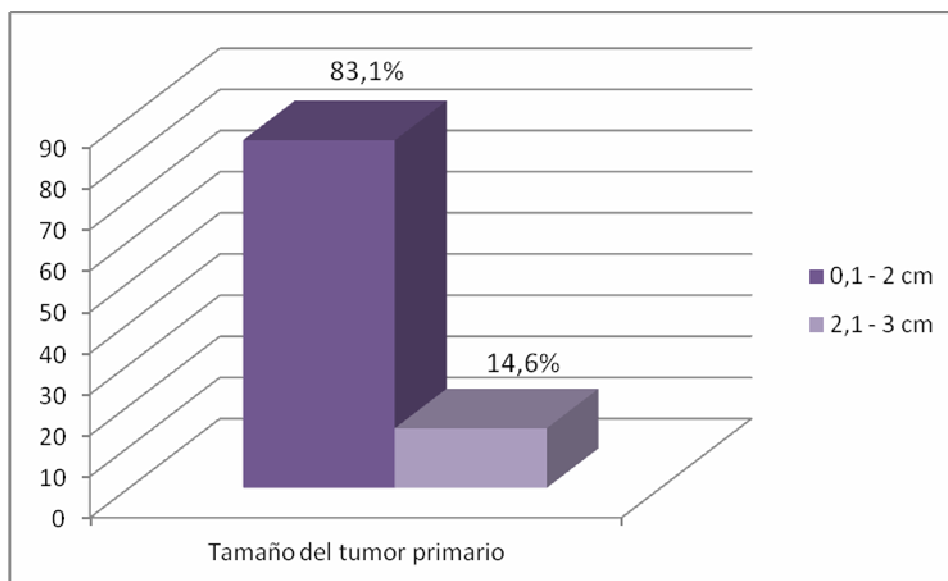


Figura 24: Distribución de los tumores primarios según su tamaño.

I.Ñ. Grado tumoral. Escala de ELSTON

Las pacientes se reclutaron en estadios I y II, por lo que el 80,2% de ellas presentaron grado tumoral de tipo I (bien diferenciado) y II (moderadamente diferenciado), mientras que el 19,7% restante se clasificaron como grado tumoral III (pobrementemente diferenciado) (Figura 25).

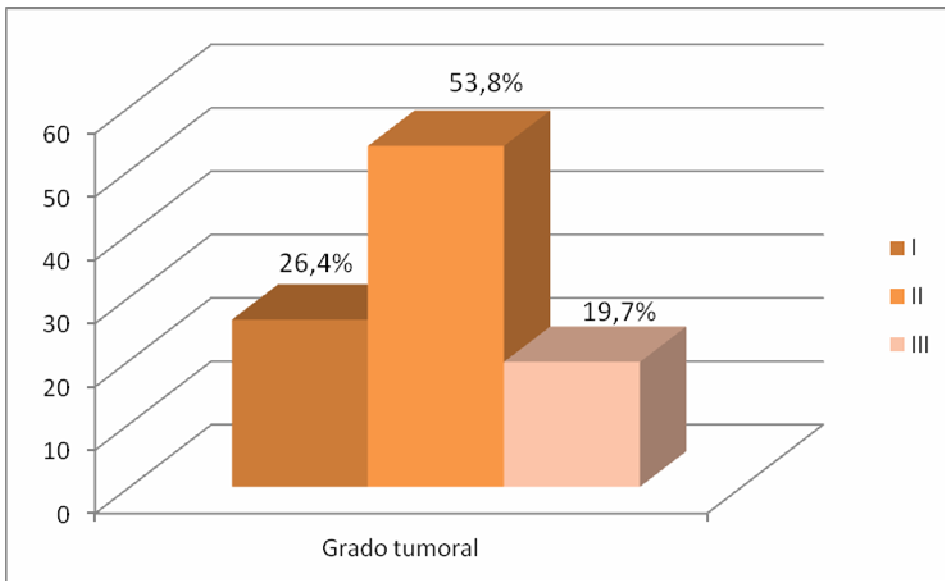


Figura 25: Grado tumoral, según la escala de ELSTON.

I.O. Tipo histológico

Con respecto al tipo histológico tumoral, 205 pacientes (67,9%) presentaron un cáncer de mama de tipo ductal. Otras 67 pacientes (22,2%) presentaron un tipo histológico lobulillar. El resto de las pacientes, el 9,8%, presentaron otros tipos histológicos: medular (2,6%), mucinoso (3,6%), adenoide quístico (0,3%) o mixto (3,3%) (Figura 26).

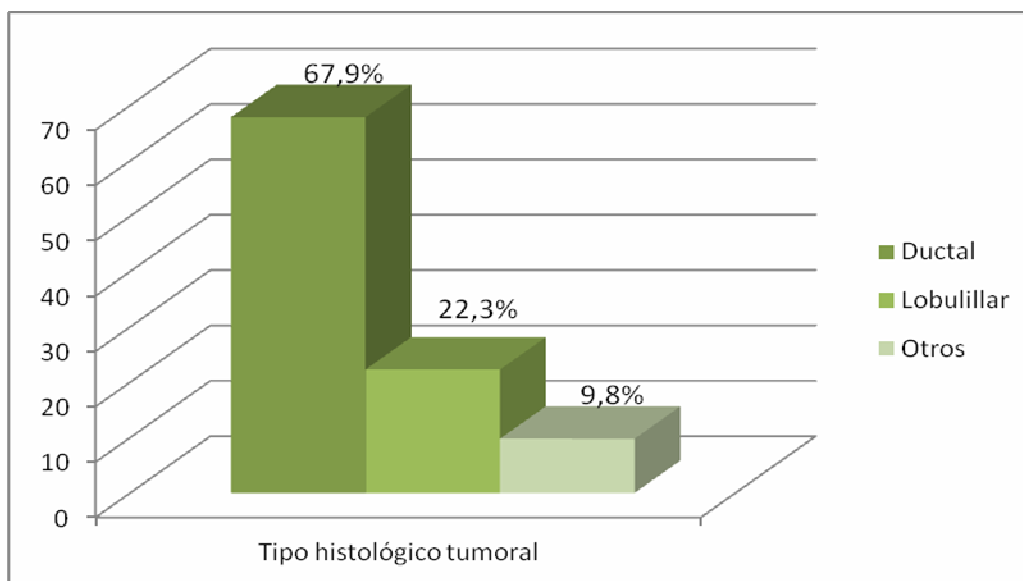


Figura 26. Distribución de los tumores primarios según el tipo histológico.

I.P. Estadío tumoral

Con respecto al estadío tumoral, 218 pacientes (72,2%) presentaban estadío I, 62 pacientes (20,4%) presentaban estadío IIA, 11 pacientes (3,7%) se encuadraron en el estadío IIB. Hubo 11 pacientes en las que no se pudo recuperar el dato (3,7%) (Figura 27).

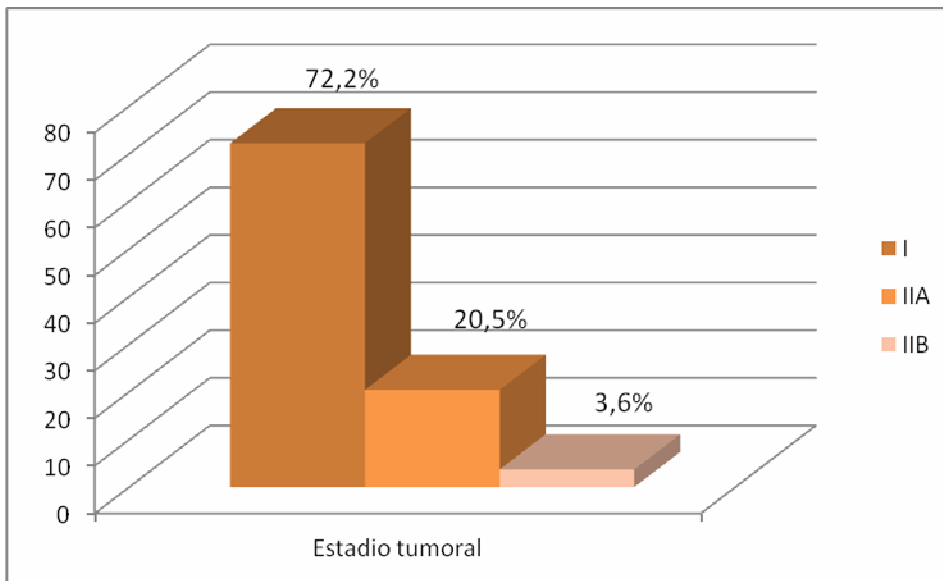


Figura 27. Distribución de los tumores primarios por estadios.

I.Q. Receptores de estrógenos

Se estudió la presencia o ausencia de receptores de estrógenos en los tumores primarios. Se encontraron RE en 247 pacientes (82,6%). No se hallaron RE en las 52 pacientes restantes (17,4%). Hubo 3 pacientes en las que no se pudo determinar la presencia o ausencia de estos receptores (Figura 28).

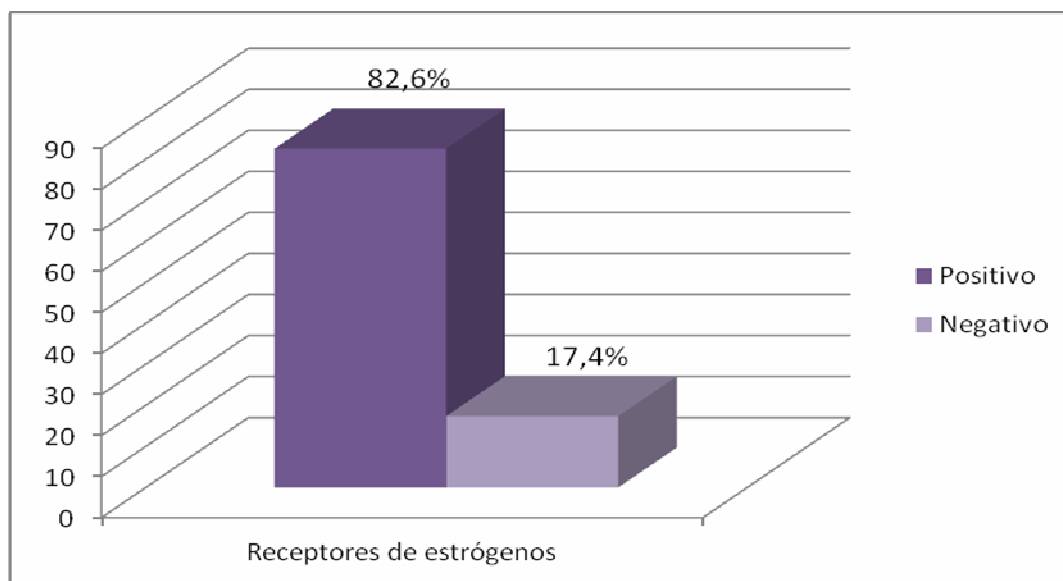


Figura 28: Determinación de los receptores de estrógenos.

I.R. Receptores de progesterona

Se estudió también la presencia o ausencia de RP en el tumor primario. Se observó positividad para RP en 226 pacientes (75,6%). El resultado fue negativo para los 73 casos restantes (24,4%). Hubo 3 pacientes en las que no se pudo determinar la presencia o ausencia de estos receptores (Figura 29).

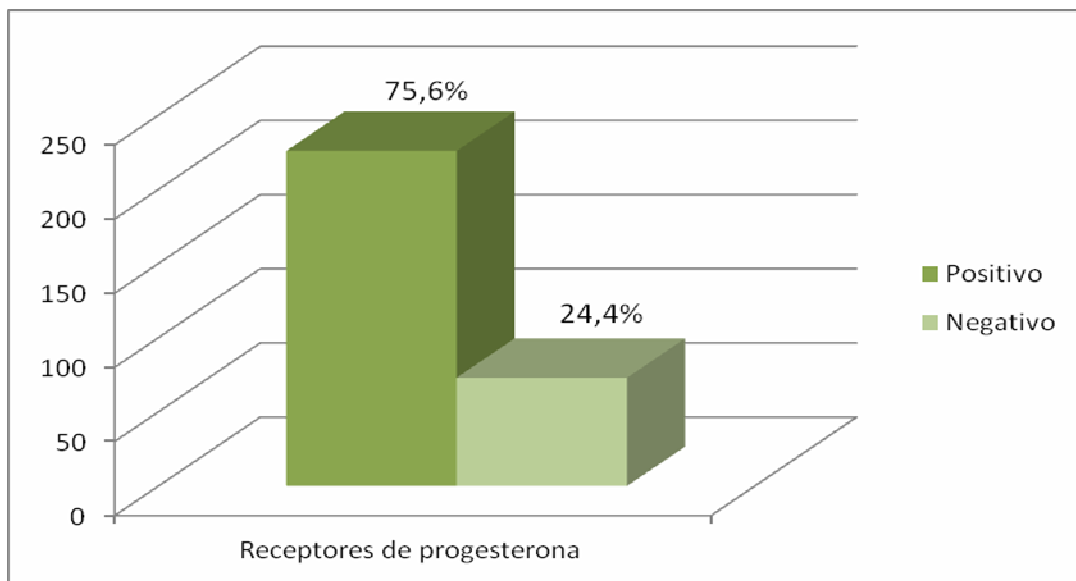


Figura 29: Determinación de los receptores de progesterona.

I.S. Índice de proliferación Ki67

En la población del estudio, este índice fue menor o igual al 5% en 125 pacientes (41,8%). El índice se mantuvo en el rango del 6% al 50% en 129 pacientes (43,1%), mientras que alcanzó valores superiores al 51% en 45 pacientes (15,1%). El porcentaje de proliferación celular no se pudo determinar a través de este anticuerpo en 3 mujeres (Figura 30).

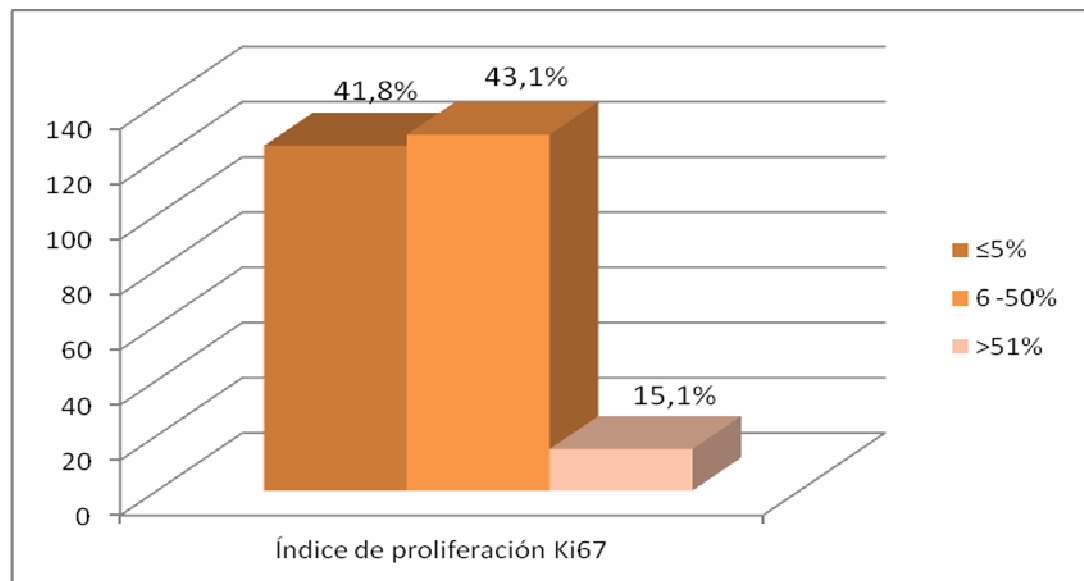


Figura 30: Índice de proliferación Ki67.

I.T. Oncogén HER-2neu

Se estudió la sobreexpresión del receptor codificado por el gen HER-2neu (cantidad de proteína expresada por este gen).

Se encontró sobreexpresión en 37 pacientes (12,4%), mientras que en 262 pacientes (87,6%) no se encontró exceso de expresión. Hubo 3 pacientes en las que no se pudo determinar este dato.

II. ESTUDIO Y COMPARACIÓN DE LA MAMAGLOBINA Y CITOQUERATINA 19 OBTENIDOS MEDIANTE RT-PCR CONVENCIONAL Y RT-PCR A TIEMPO REAL

El estudio de las variables genéticas se realizó mediante dos técnicas de biología molecular: RT-PCR convencional y RT-PCR a tiempo real.

La expresión de MG por RT-PCR convencional fue analizada en 302 pacientes, de las cuales, el 16,5% (50/302) resultó ser positivo y el 83,5% (252/302) presentó resultado negativo.

De la misma manera se analizó la CK19 por RT-PCR convencional en 302 pacientes, de las cuales el 12,6% (38/302) resultó ser positivo y el 87,4% (264/302) presentó resultado negativo.

Teniendo en cuenta la combinación de los dos marcadores, un ganglio centinela se consideró positivo cuando uno o los dos marcadores fueran positivos (MG+/CK19-; MG-/CK19+; MG+/CK19+). Siguiendo este criterio, el 18,5% (56/302) de las pacientes se consideraron positivas y el 81,5% (246/302) resultaron negativas (MG-/CK19-).

El estudio de la expresión de CK19 por RT-PCR a tiempo real fue realizado en 69 pacientes. En 4 de estas pacientes el resultado fue no válido. De las 65 pacientes restantes, tuvieron resultado positivo el 15,4% (10/65) y el 84,6% (55/65) presentó resultado negativo.

La expresión de MG por RT-PCR a tiempo real fue analizada en 65 pacientes, de las cuales, el 13,8% (9/65) resultó ser positivo y el 86,2% (56/65) presentó resultado negativo.

Se analizó también la combinación de estos dos marcadores, encontrando que tuvieron resultado positivo (MG+/CK19-; MG-/CK19+; MG+/CK19+) el 15,4% (10/65) y el 84,6% (55/65) presentó resultado negativo (MG-/CK19-).

En las tablas XVI, XVII y XVIII se muestra la comparación entre ambas tecnologías para los resultados de cada uno de los marcadores. En ellas se observa que la correlación de resultados es exacta en el caso de la MG, con un índice kappa de 1,000 y significación $p < 0,001$. Mientras que la correlación de resultados entre las técnicas para CK19, así como para la combinación de ambos marcadores alcanzaron un índice kappa de 0,943 y significación de $p < 0,001$.

Tabla XVI. Relación entre los resultados sobre MG obtenidos mediante RT-PCR convencional y RT-PCR a tiempo real.

Variable	Categorías: recuento (%)	Tiempo Real MG+ (%)	Tiempo Real MG - (%)	Kappa	p
RT-PCR MG	Positiva: 9 (13,8)	9 (100,0)	0 (0,0)	1,000	<0,001
	Negativa: 56 (86,2)	0 (0,0)	56 (100,0)		

Tabla XVII. Relación entre los resultados sobre CK19 obtenidos mediante RT-PCR convencional y RT-PCR a tiempo real.

Variable	Categorías: recuento (%)	Tiempo Real CK19+ (%)	Tiempo Real CK19 - (%)	Kappa	p
RT-PCR CK19	Positiva: 11 (16,9)	10 (90,9)	1 (9,1)	0,943	<0,001
	Negativa: 54 (83,1)	0 (0)	54 (100,0)		

Tabla XVIII. Relación entre los resultados sobre la combinación de MG y/o CK19 obtenidos mediante RT-PCR convencional y RT-PCR a tiempo real.

Variable	Categorías: recuento (%)	Tiempo Real MG y/o CK19 + (%)	Tiempo Real MG y/o CK19 - (%)	Kappa	p
RT-PCR MG y/o CK19	Positiva: 11 (16,9)	10 (90,9)	1 (9,1)	0,943	<0,001
	Negativa: 54 (83,1)	0 (0)	54 (100,0)		

Una paciente presentó resultado positivo para CK19 determinada por RT-PCR convencional, mientras que por RT-PCR a tiempo real el resultado fue negativo. Este resultado es un falso positivo de la RT-PCR convencional (Tabla VII).

El índice kappa indica la fiabilidad entre métodos. Cuando el índice está por encima de 0,80 se considera que la fiabilidad es excelente. El índice kappa que se obtiene de la comparación entre métodos para la MG alcanza el valor de 1,000. El índice kappa que se obtiene de la comparación entre métodos para la CK19 alcanza el valor de 0,943; así como el que se obtiene de la comparación de métodos para la combinación de los dos marcadores.

La técnica de RT-PCR convencional se ha realizado en 302 pacientes, mientras que la RT-PCR a tiempo real se realizó en 69 pacientes.

A la luz de los anteriores resultados podemos concluir que las dos tecnologías son equivalentes, por lo que el estudio de la relación entre las variables clínicas y las variables genéticas se ha realizado considerando los resultados obtenidos con la técnica de RT-PCR convencional realizada en 302 pacientes.

III. ANÁLISIS DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA RT-PCR DE LOS GENES MAMAGLOBINA Y CITOQUERATINA 19

Se realizó el estudio para valorar la sensibilidad, especificidad, el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo de la técnica RT-PCR para la detección de micrometástasis en ganglio centinela frente a las técnicas de H&E e IHQ (Tablas XIX y XX).

Tabla XIX. Valoración de la sensibilidad, especificidad, el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo de la técnica RT-PCR para la detección de micrometástasis en ganglio centinela, en comparación con la técnica de H&E.

		H&E		
RT-PCR MG		Positiva	Negativa	p
Positiva	% dentro de RT-PCR MG	92,5 ¹	7,5	0,755
	% dentro de H&E	91,4 ²	40,4	
Negativa	% dentro de RT-PCR MG	44	56,0 ³	
	% dentro de H&E	8,6	59,6 ⁴	
RT-PCR CK19		Positiva	Negativa	p
Positiva	% dentro de RT-PCR CK19	90,2 ¹	9,8	0,222
	% dentro de H&E	93,3 ²	55,3	
Negativa	% dentro de RT-PCR CK19	44,7	55,3 ³	
	% dentro de H&E	6,7	44,7 ⁴	
RT-PCR MG y/o CK19		Positiva	Negativa	p
Positiva	% dentro de RT-PCR MG y/o CK19	92,7 ¹	7,3	0,233
	% dentro de H&E	89,4 ²	38,3	
Negativa	% dentro de RT-PCR MG y/o CK19	48,2	51,8 ³	
	% dentro de H&E	10,6	61,7 ⁴	

¹ Valor predictivo positivo. ² Sensibilidad. ³ Valor predictivo negativo. ⁴ Especificidad.

La sensibilidad está considerada como la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo cuyo resultado real sea el definido como positivo respecto a la condición que estudia la prueba. En la relación estadística de los resultados de la RT-PCR frente a la prueba *gold-standard* (H&E), la sensibilidad de la técnica alcanza el valor de 91,4% al considerar los resultados de la RT-PCR para MG ($p=0,755$), 93,3% al considerar los resultados de la RT-PCR para CK19 ($p=0,222$) y 89,4% teniendo en cuenta los resultados de la RT-PCR para MG y/o CK19 ($p=0,233$) (Tabla XIX).

La especificidad se define como la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo cuyo estado real sea el definido como negativo. En nuestro estudio, comparando la relación entre los resultados obtenidos mediante la técnica de RT-PCT frente a los resultados obtenidos por H&E, la especificidad alcanza el valor de 59,6% al considerar los resultados de la RT-PCR para MG ($p=0,755$), 44,7% al considerar los resultados de la RT-PCR para CK19 ($p=0,222$) y 61,7% teniendo en cuenta los resultados de la RT-PCR para MG y/o CK19 ($p=0,233$) (Tabla XIX).

La tasa de valor predictivo positivo se considera como los verdaderos positivos entre los resultados positivos de la prueba. En nuestro estudio, comparando la relación entre los resultados obtenidos mediante la técnica de RT-PCR frente a los resultados obtenidos por H&E, la tasa de valor predictivo alcanza el valor de 92,5% al considerar los resultados de la RT-PCR para MG ($p=0,755$); 90,2% al considerar los resultados de la RT-PCR para CK19 ($p=0,222$) y 92,7% teniendo en cuenta los resultados de la RT-PCR para MG y/o CK19 ($p=0,233$) (Tabla XIX).

El valor predictivo negativo se define como la proporción de los verdaderos negativos con respecto a los resultados negativos de la RT-PCR. En el estudio de la relación entre los resultados obtenidos mediante la técnica de RT-PCR frente a los

resultados obtenidos por H&E en nuestra población, el valor predictivo negativo alcanza un valor de 56,0% al considerar los resultados de la RT-PCR para MG ($p=0,755$); 55,3% al considerar los resultados de la RT-PCR para CK19 ($p=0,222$) y 51,8% teniendo en cuenta los resultados de la RT-PCR para MG y/o CK19 ($p=0,233$) (Tabla XIX).

Tabla XX. Valoración de la sensibilidad, especificidad, el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo de la técnica RT-PCR para la detección de micrometástasis en ganglio centinela, en comparación con la técnica de Inmunohistoquímica.

		IHQ		
RT-PCR MG		Positiva	Negativa	p
Positiva	% dentro de RT-PCR MG	99,1 ¹	0,9	0,013
	% dentro de IHQ	95,1 ²	18,2	
Negativa	% dentro de RT-PCR MG	57,1	42,9 ³	
	% dentro de IHQ	4,9	81,8 ⁴	
RT-PCR CK19		Positiva	Negativa	p
Positiva	% dentro de RT-PCR CK19	98,7 ¹	1,3	0,146
	% dentro de IHQ	96,3 ²	27,3	
Negativa	% dentro de RT-PCR CK19	52,9	47,1 ³	
	% dentro de IHQ	3,7	72,7 ⁴	
RT-PCR MG y/o CK19		Positiva	Negativa	p
Positiva	% dentro de RT-PCR MG y/o CK19	100,0 ¹	0	>0,999
	% dentro de IHQ	93,8 ²	0	
Negativa	% dentro de RT-PCR MG y/o CK19	57,7	42,3 ³	
	% dentro de IHQ	6,2	100,0 ⁴	

¹ Valor predictivo positivo. ² Sensibilidad. ³ Valor predictivo negativo. ⁴ Especificidad.

En la relación estadística de los resultados de la RT-PCR frente a la prueba IHQ, se alcanzan valores de sensibilidad de 95,1% al considerar los resultados de la RT-PCR para MG ($p=0,013$), 96,3% al considerar los resultados de la RT-PCR para CK19

($p=0,146$) y 93,8% teniendo en cuenta los resultados de la RT-PCR para MG y/o CK19 ($p>0,999$) (Tabla XX).

En la relación estadística entre los resultados obtenidos mediante la técnica de RT-PCR frente a los resultados obtenidos por IHQ, los valores de especificidad son del 81,8% al considerar los resultados de la RT-PCR para MG ($p=0,013$), 72,4% al considerar los resultados de la RT-PCR para CK19 ($p=0,146$) y 100,0% teniendo en cuenta los resultados de la RT-PCR para MG y/o CK19 ($p>0,999$) (Tabla XX).

La tasa de valor predictivo positivo en nuestro estudio, comparando la relación entre los resultados obtenidos mediante la técnica de RT-PCR frente a los resultados obtenidos por IHQ, alcanza valores de 99,1% al considerar los resultados de la RT-PCR para MG ($p=0,013$); 98,7% al considerar los resultados de la RT-PCR para CK19 ($p=0,146$) y 100,0% teniendo en cuenta los resultados de la RT-PCR para MG y/o CK19 ($p>0,999$) (Tabla XX).

En el análisis de la relación entre los resultados obtenidos mediante la técnica de RT-PCT frente a los resultados obtenidos por IHQ en nuestra población para establecer el valor predictivo negativo, se obtienen valores de 42,9% al considerar los resultados de la RT-PCR para MG ($p=0,013$); 47,1% al considerar los resultados de la RT-PCR para CK19 ($p=0,146$) y 42,3% teniendo en cuenta los resultados de la RT-PCR para MG y/o CK19 ($p>0,999$) (Tabla XX).

IV. ESTUDIO DE LA RELACIÓN DE LA RT-PCR DE LOS MARCADORES MG Y CK19 CON LOS FACTORES PRONÓSTICO

IV.A. Factores pronóstico clásicos

El estudio de la relación de la expresión de MG y CK19 con la afectación ganglionar mostró la existencia de una relación estadísticamente significativa tanto en su análisis de manera independiente como conjunta.

Se observó que con mayor frecuencia las pacientes que no presentaban afectación ganglionar no mostraban la expresión de estos marcadores genéticos.

De las 48 mujeres que presentaron afectación ganglionar, el 58,3% expresa MG, el 43,7% expresa CK19 y el 60,4% alguno de estos dos marcadores.

Sin embargo, en las mujeres que no presentaron afectación ganglionar la expresión de MG es del 8,7%, CK19 del 6,7% y en el análisis combinado de ambos marcadores la expresión es del 10,6% ($p < 0,001$). (Tabla XXI) (Figuras 31, 32 y 33).

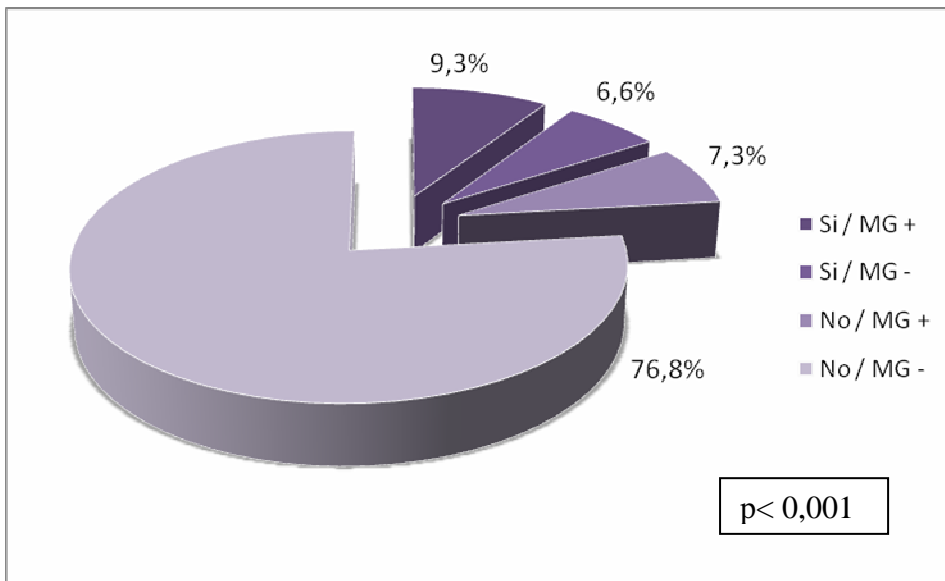


Figura 31: Relación entre la afectación ganglionar y la variable genética RT-PCR para MG.

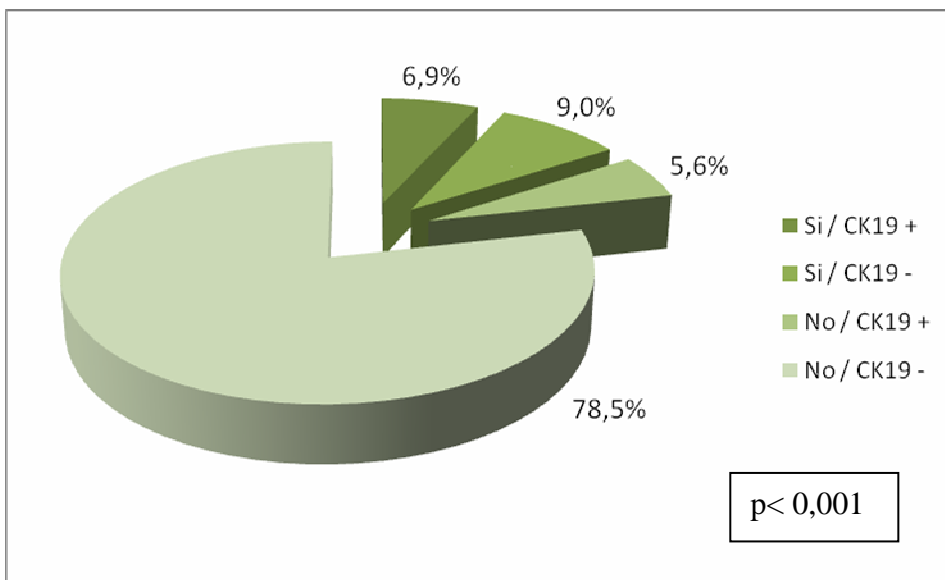


Figura 32: Relación entre la afectación ganglionar y la variable genética RT-PCR para CK19.

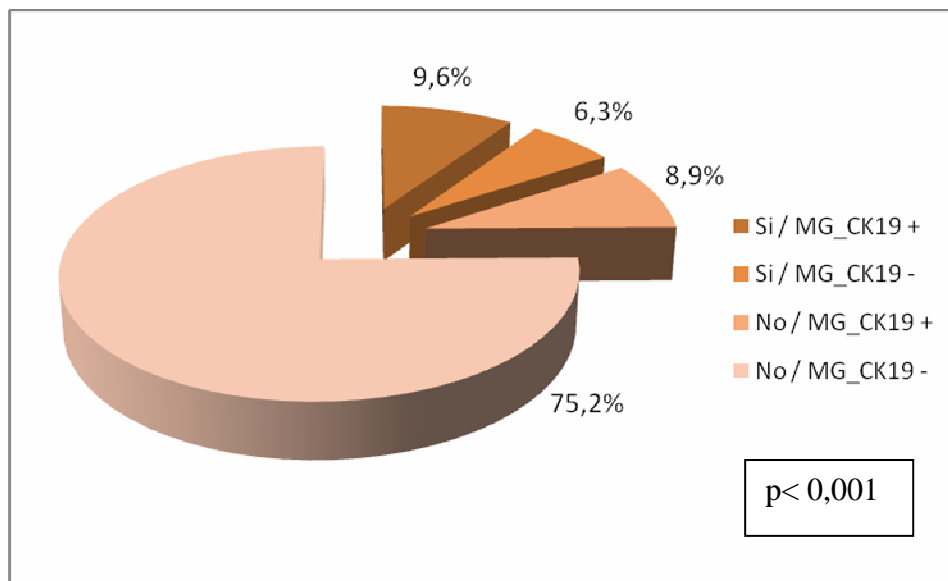


Figura 33: Relación entre la afectación ganglionar y la variable genética RT-PCR para MG y/o CK19.

No se encontró ninguna relación entre el tamaño del tumor primario y la expresión de los genes objeto de estudio. En las pacientes con tumores primarios entre 0,1 – 2 cm, la expresión de MG fue de 15,5%, CK19 del 12,0% y MG y/o CK19 en conjunto del 17,5%, mientras que su ausencia fue del 84,5% para la MG, 88,0% para la CK19 y para MG y/o CK19 fue del 82,5%. En las pacientes con tumores primarios de entre 2,1 – 3cm, la expresión de MG era del 23,3%, la de CK19 era del 18,2% y la de MG y/o CK19 del 27,3%. La ausencia de estos marcadores se distribuyó: MG 76,7%, CK19 81,8% y MG y/o CK19 72,7% (MG $p=0,123$, CK19 $p=0,255$ y MG_CK19 $p=0,128$) (Tabla XXI).

Respecto al grado tumoral se observó relación significativa en la expresión de MG y el análisis conjunto de ambos marcadores. La presencia de MG fue más frecuente en pacientes con tumores de grado III (28,8%) y así se reflejó también cuando se analizó

la presencia de MG y/o CK19 (30,5%) (Figura 34). Se observó una relación en la que cuanto mayor es el grado tumoral, más frecuente es la expresión de MG y que cuanto menor es el grado del tumor, menor es la presencia de MG (88,6%) ($p=0,017$). De igual forma se observó esta relación en el análisis conjunto de MG y CK19 ($p=0,030$) (Figura 35) (Tabla XXI).

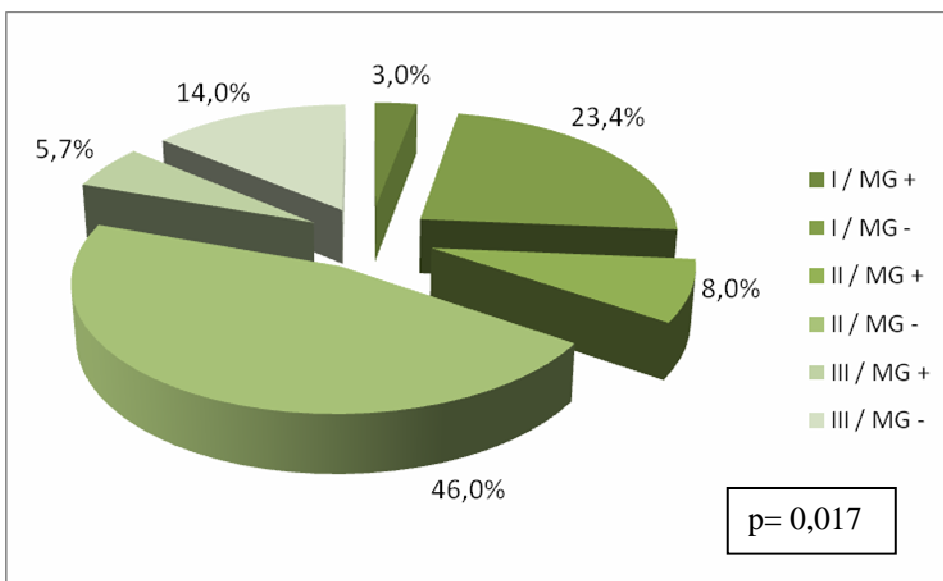


Figura 34: Relación entre el grado tumoral y la variable genética RT-PCR para MG.

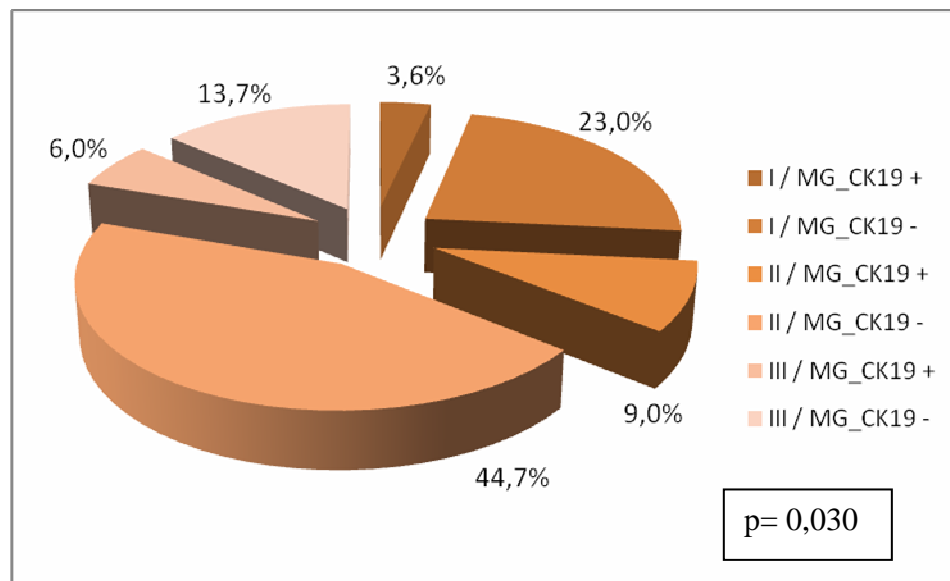


Figura 35: Relación entre el grado tumoral y la variable genética RT-PCR para MG y/o CK19.

En cuanto al tipo histológico del tumor primario, no se encontraron relaciones estadísticamente significativas. Ninguno de los tipos histológicos contemplados presentó relación con la expresión de MG, CK19, ni MG y/o CK19 (Tabla XXI).

Tabla XXI: Relación entre la RT-PCR de los marcadores MG y CK19 y los factores pronóstico clásicos.

	Categorías: recuento (%)	RT-PCR		p	RT-PCR		p	RT-PCR		p
		MG+ (%)	MG- (%)		CK19+ (%)	CK19- (%)		MG y/o CK19+ (%)	MG y/o CK19- (%)	
Afectación ganglionar	Si: 48 (15,9)	28 (58,3)	20 (41,7)	<0,001	21 (43,7)	27 (56,2)	<0,001	29 (60,4)	19 (39,6)	<0,001
	No: 254 (84,1)	22 (8,7)	232 (91,3)		17 (6,7)	237 (93,3)		27 (10,6)	227 (89,4)	
Tamaño tumor primario	0,1 - 2 cm: 251 (84,5)	39 (15,5)	212 (84,5)	0,123	30 (12,0)	221 (88,0)	0,255	44 (17,5)	207 (82,5)	0,128
	2,1 - 3 cm: 44 (14,5)	11 (23,3)	33 (76,7)		8(18,2)	36 (81,8)		12 (27,3)	32 (72,7)	
Grado tumoral	I: 79 (26,4)	9 (11,4)	70 (88,6)	0,017	6 (7,6)	73 (92,4)	0,153	11 (13,9)	68 (86,1)	0,030
	II: 161 (53,8)	24 (14,9)	137 (85,1)		21 (13,1)	140 (86,9)		27 (16,8)	134 (83,2)	
	III: 59 (19,7)	17 (28,8)	42 (71,1)		11 (18,6)	48 (81,4)		18 (30,5)	41 (69,5)	
Tipo histológico	Ductal: 205 (67,9)	39 (19,1)	166 (80,9)	0,119	31 (15,1)	174 (84,9)	0,316	44 (21,5)	161 (78,5)	0,202
	Lobulillar: 67 (22,2)	9 (13,4)	58 (86,6)		5 (7,5)	62 (92,5)		9 (13,4)	58 (86,6)	
	Medular: 8 (2,6)	0 (0)	8 (100)		0 (0)	8 (100)		0 (0)	8 (100)	
	Mucinoso: 11 (3,6)	1 (9,1)	10 (90,9)		0 (0)	11 (100)		1 (9,1)	10 (90,9)	
	Adenoide quístico: 1 (0,3)	0 (0)	1 (100)		0 (0)	1 (100)		0 (0)	1 (100)	
	Mixto: 10 (3,3)	1 (10)	9 (90)		2 (20)	8 (80)		2 (80)	8 (80)	

IV.B. Factores pronóstico biológicos

En el estudio de la expresión de MG y CK19 en relación con los RE en el tumor primario, se encontró asociación significativa para la CK19 y en el análisis conjunto de ambos marcadores. Se observa una tendencia clínica entre la ausencia de MG y la presencia de RE (85,0%) ($p=0,078$). Se alcanza relación significativa entre la ausencia de CK19 y la presencia de RE (89,1%) ($p=0,044$) (Figura 36), lo cual se refleja también en la relación entre la ausencia de ambos marcadores y la presencia de RE (83,4%) ($p=0,040$) (Figura 37) (Tabla XXII).

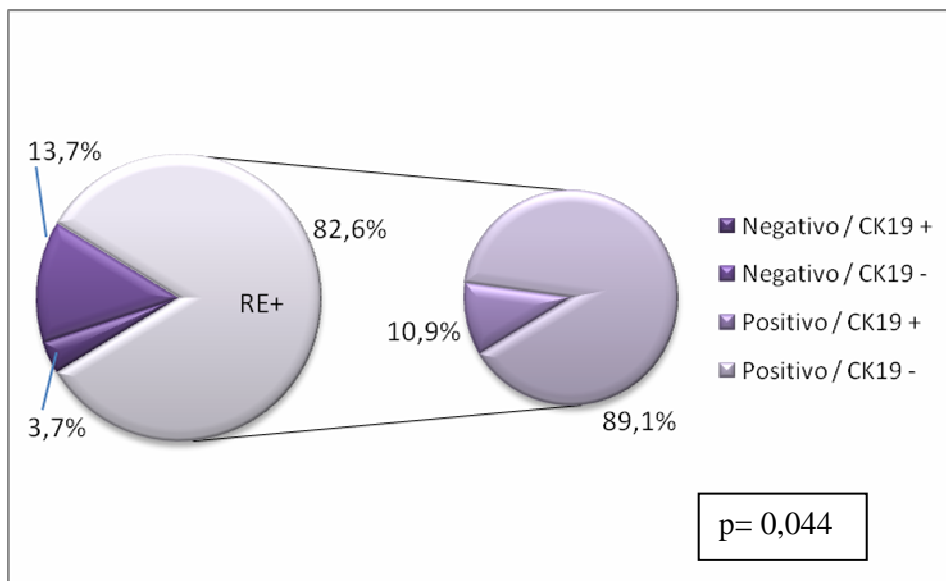


Figura 36: Relación entre la presencia de receptores de estrógenos en el tumor primario y la variable genética RT-PCR para CK19.

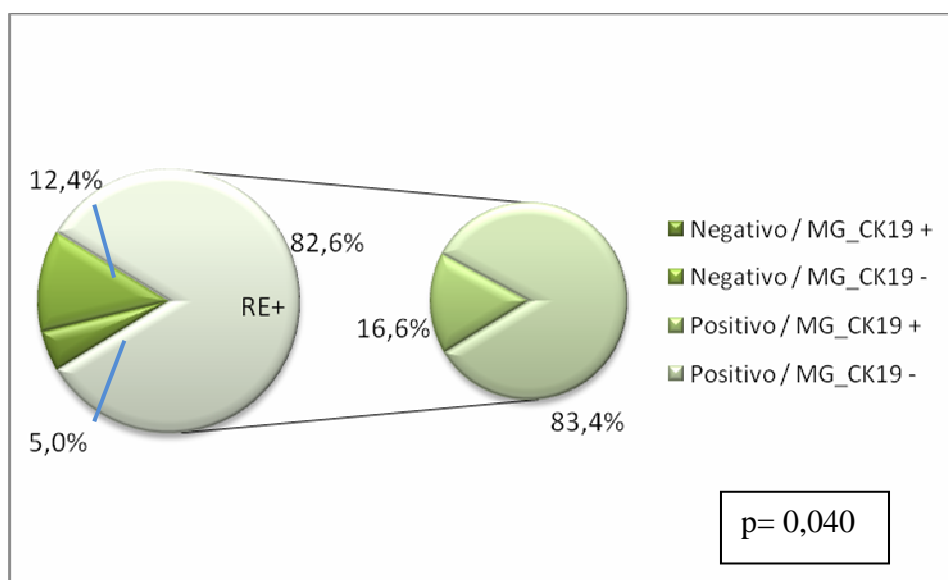


Figura 37: Relación entre la presencia de receptores de estrógenos el tumor primario y la variable genética RT-PCR para MG y/o CK19.

Sin embargo, cuando se estudió la relación con los RP no se observó relación significativa. En las pacientes que presentaron RP, la expresión de MG fue del 15,9%; la de CK19 del 12,4% y la de MG y/o CK19 del 17,7%, mientras que la ausencia de MG fue del 84,1%, la de CK19 del 87,6% y la de MG y/o CK19 del 82,3%. En el estudio de las pacientes que no presentaron RP la expresión de MG fue del 19,2%, la de CK19 del 13,7% y la de MG y/o CK19 del 21,9%, mientras que la ausencia de MG fue del 80,8%, la de CK19 del 86,3% y la de ambos marcadores del 78,1% (Tabla XXII).

Se observó relación estadísticamente significativa entre las variables MG y CK19 estudiadas en conjunto y el índice de proliferación Ki67. En las pacientes que presentaron un Ki67 $\leq 5\%$ la presencia de MG y/o CK19 fue del 21,6%, mientras que la ausencia fue del 78,4%. En las que el índice de proliferación se encontró en el rango entre el 6% y el 50%, la presencia de MG y/o CK19 fue del 12,4%, mientras que la ausencia fue del 87,6%. En las pacientes en las que el Ki67 era $\geq 51\%$, la presencia de MG y/o CK19 fue del 28,9% mientras que la ausencia fue del 71,1% ($p=0,028$) (Figura 38) (Tabla XXII). Se encontró además una tendencia clínica en cuanto al porcentaje de expresión del Ki67 y la expresión de MG. En las pacientes en las que el Ki67 $\leq 5\%$, la presencia de MG fue del 19,2% y su ausencia del 81,1%. En las que el índice de proliferación se encontró en el rango entre el 6% y el 50% la presencia de MG fue del 11,6% y la ausencia del 88,4%. Por último, en las pacientes que presentaron un Ki67 $> 51\%$ la presencia de MG fue del 24,4%, mientras que su ausencia fue del 75,6%. ($p=0,084$) (Tabla XXII).

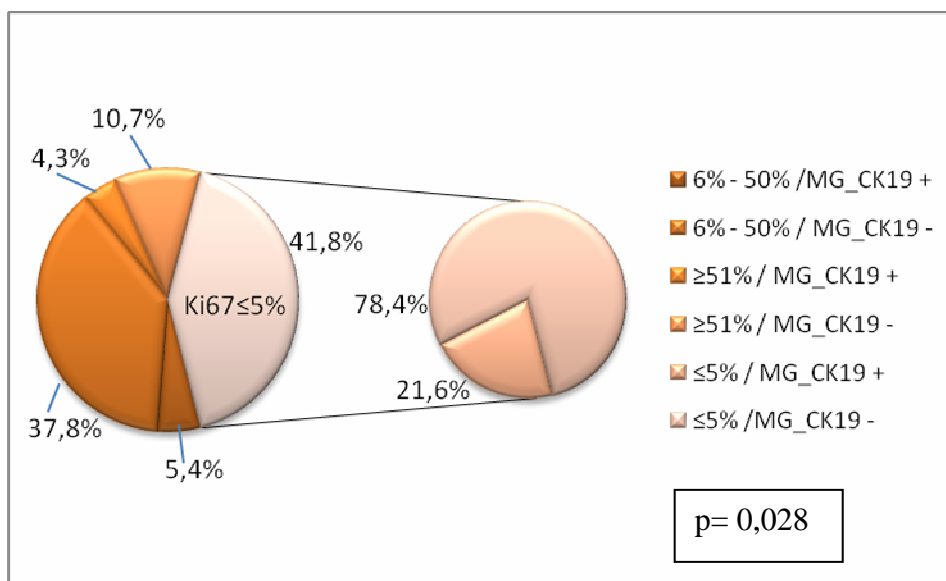


Figura 38: Relación entre el índice de proliferación Ki67 en el tumor primario y la variable genética RT-PCR para MG y/o CK19.

Respecto a la presencia de HER2-neu, tampoco se observó relación estadísticamente significativa. Aquellas pacientes que presentaron HER2-neu mostraron presencia de MG en el 24,3%; presencia de CK19 en el 13,5% y presencia de alguno o ambos marcadores en el 24,3%; mientras que la ausencia de MG fue del 75,7%; la de CK fue del 86,5% y la ausencia de ambos marcadores en conjunto fue del 75,7%. De las pacientes que no presentaron HER2-neu, el 15,6% presentaron MG, el 12,6% presentaron CK19 y el 17,9% presentaron alguno o ambos marcadores. En estas pacientes la ausencia de MG fue del el 84,4%, la ausencia de CK19 fue del 87,4% y la ausencia de ambos marcadores fue del 82,1%. (MG $p=0,186$; CK $p=0,796$ y MG_CK19 $p=0,351$) (Tabla XXII).

Tabla XXII: Relación entre la RT-PCR de los marcadores MG y CK19 con los factores pronóstico biológicos.

Variable	Categorías: recuento (%)	RT-PCR	RT-PCR	p	RT-PCR	RT-PCR	p	RT-PCR	RT-PCR	p
		MG+ (%)	MG- (%)		CK19+ (%)	CK19- (%)		MG y/o CK19+ (%)	MG y/o CK19- (%)	
Receptores de estrógenos	Positivo: 247 (82,6)	37 (15)	210 (85)	0,078	27 (10,9)	220 (89,1)	0,044	41 (16,6)	206 (83,4)	0,040
	Negativo: 52 (17,4)	13 (25)	39 (75)		11 (21,2)	41 (78,8)		15 (28,8)	37 (71,2)	
Receptores de progesterona	Positivo: 226 (75,6)	36 (15,9)	190 (84,1)	0,518	28 (12,4)	198 (87,6)	0,770	40 (17,7)	186 (82,3)	0,422
	Negativo: 73 (24,4)	14 (19,2)	59 (80,8)		10 (13,7)	63 (86,3)		16 (21,9)	57 (78,1)	
Ki67	≤ 5%: 125 (41,8)	24 (19,2)	101 (80,8)	0,087	19 (15,2)	106 (84,8)	0,151	27 (21,6)	98 (78,4)	0,028
	6% - 50% : 129 (43,1)	15 (11,6)	114 (88,4)		11 (8,5)	118 (91,5)		16 (12,4)	113 (87,6)	
	≥ 51%: 45 (15,1)	11 (24,4)	34 (75,6)		8 (17,8)	37 (82,2)		13 (28,9)	32 (71,1)	
Her2neu	Positivo: 37 (12,4)	9 (24,3)	28 (75,7)	0,186	5 (13,5)	32 (86,5)	0,796	9 (24,3)	28 (75,7)	0,351
	Negativo: 262 (87,6)	41 (15,6)	221 (84,4)		33 (12,6)	229 (87,4)		47 (17,9)	215 (82,1)	

V. ESTUDIO DE LA RELACIÓN DE LA RT-PCR DE LOS MARCADORES MG Y CK19 CON OTROS FACTORES INCLUÍDOS EN EL ESTUDIO

En el estudio de la relación de la expresión de MG y CK19 con los resultados de la tinción por H&E, se encontró relación significativa para la MG, la CK19 y en el análisis de MG y/o CK19. De las 47 mujeres que presentaron H&E positiva, el 59,5% expresó MG, el 44,7% expresó CK19 y el 61,7% alguno o ambos marcadores, mientras que su ausencia fue del 40,4% para la MG, del 55,3% para la CK19 y del 38,3% para ambos marcadores.

En las 255 pacientes que presentaron H&E negativa, el 8,6% expresó MG, el 6,7% expresó CK19 y el 10,6% presentó alguno o ambos marcadores, mientras que su ausencia fue del 91,4% para MG, del 93,3% para la CK19 y del 89,4% para ambos marcadores. (MG $p<0,001$; CK $p<0,001$ y MG_CK19 $p<0,001$) (Figuras 39, 40 y 41) (Tabla XXIII).

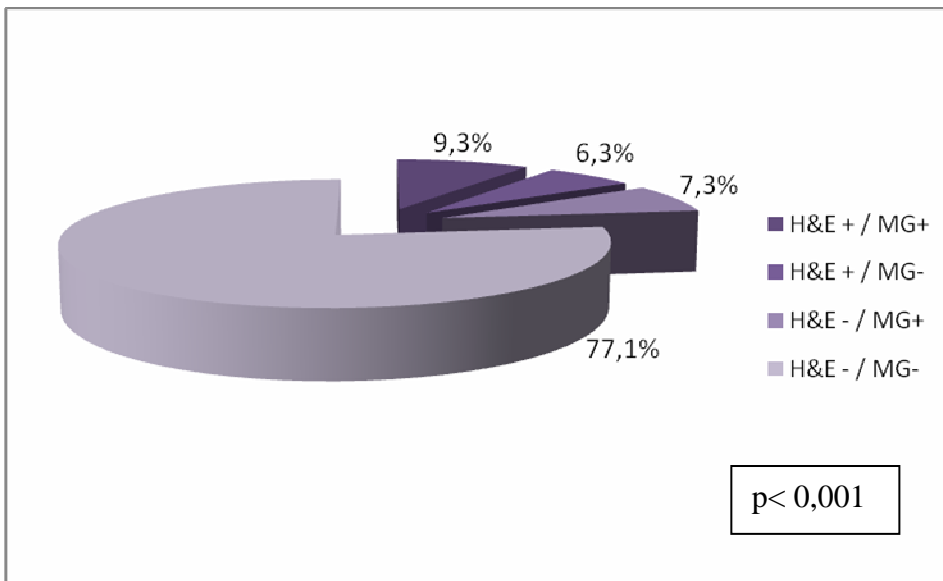


Figura 39: Relación entre el resultado de la tinción con Hematoxilina-Eosina y la variable genética RT-PCR para MG.

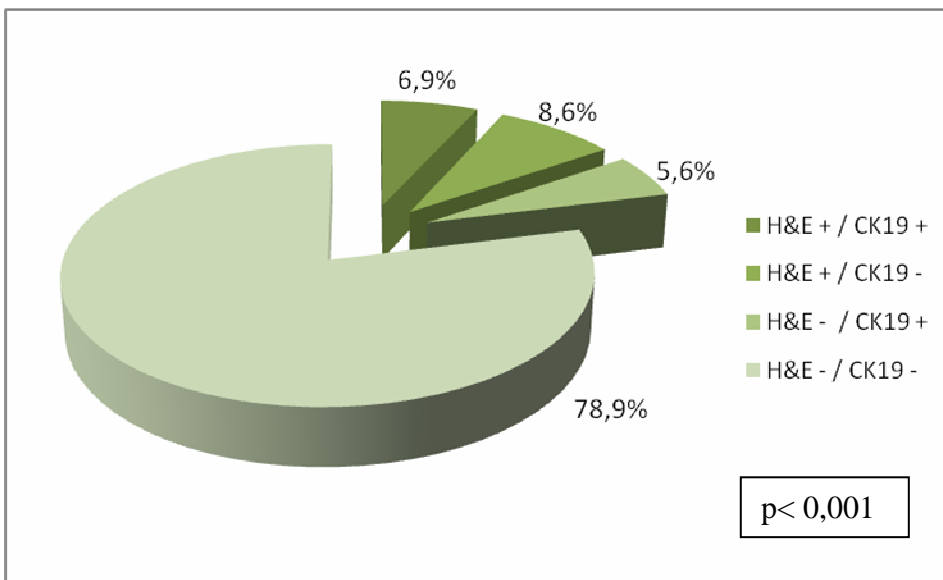


Figura 40: Relación entre el resultado de la tinción con Hematoxilina-Eosina y la variable genética RT-PCR para CK19.

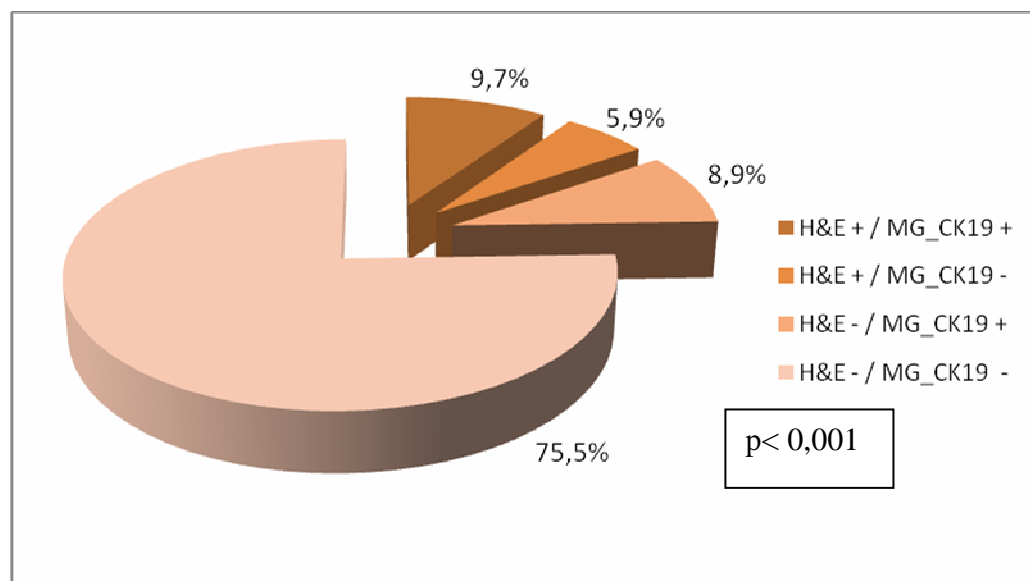


Figura 41: Relación entre el resultado de la tinción con Hematoxilina-Eosina y la variable genética RT-PCR para MG y/o CK19.

Respecto a la tinción con IHQ, se observó relación estadísticamente significativa en la expresión de MG, en la de CK19 y en el análisis de MG y/o CK19. En aquellas mujeres en las que el resultado de la tinción IHQ fue positiva, la expresión de MG fue del 81,8%, la de CK19 fue del 72,2% y la de MG y/o CK19 fue del 100%. La ausencia de estos marcadores se distribuyó: MG 18,2%, CK19 27,3% y MG y/o CK19 0%. En el caso de las mujeres que presentaron resultado de la tinción IHQ negativo, la presencia de MG fue del 4,9%, la de CK19 del 3,7% y la de MG y/o CK19 fue del 6,2%. Sin embargo, en estas mujeres, la ausencia de MG alcanzó el 95,1%, la de CK19 fue del 96,3% y la de ambos marcadores fue del 93,8% (MG $p < 0,001$; CK $p < 0,001$ y MG_CK19 $p < 0,001$) (Figuras 42, 43 y 44) (Tabla XXIII). Esto nos indica una alta probabilidad de no encontrar presencia de los marcadores por RT-PCR cuando la tinción IHQ es negativa.

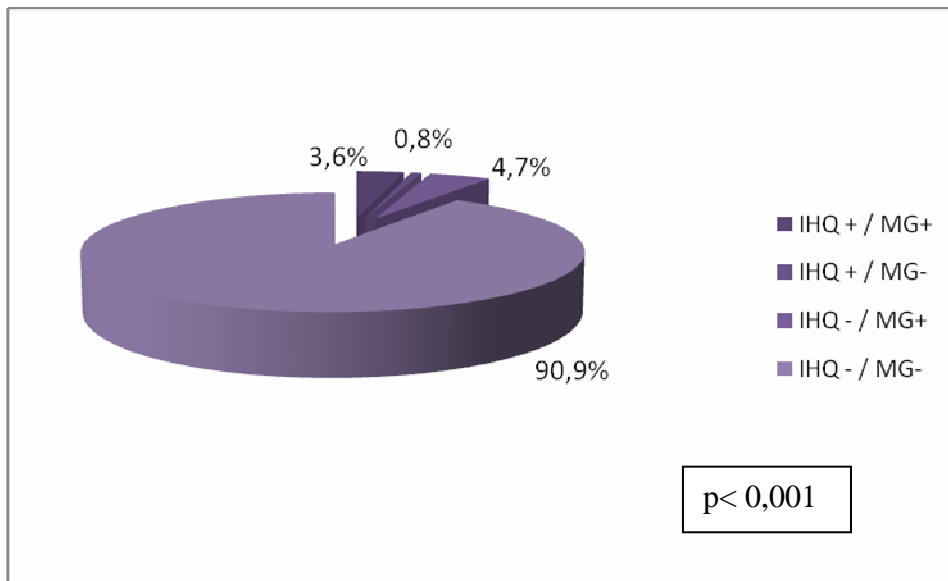


Figura 42: Relación entre el resultado de la Inmunohistoquímica y la variable genética RT-PCR para MG.

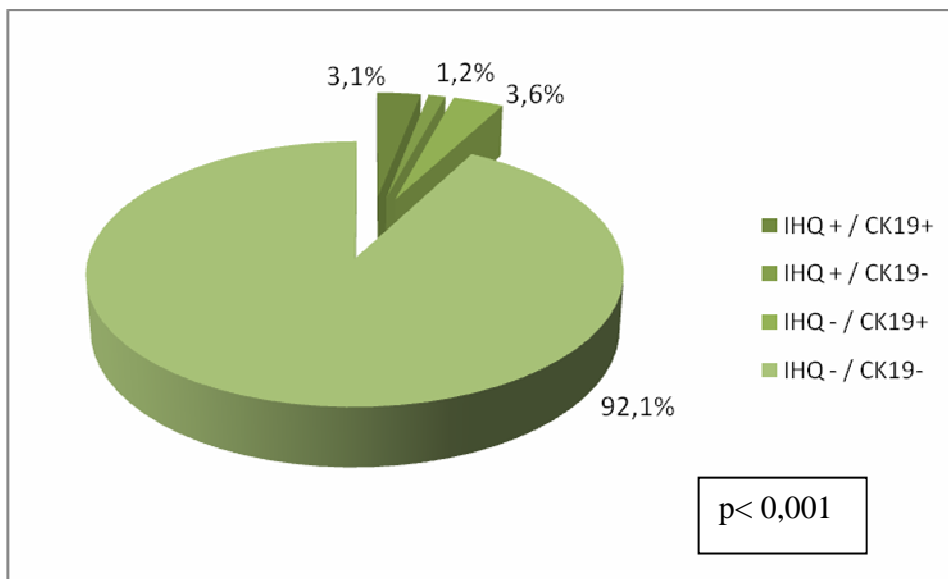


Figura 43: Relación entre el resultado de la Inmunohistoquímica y la variable genética RT-PCR para CK19.

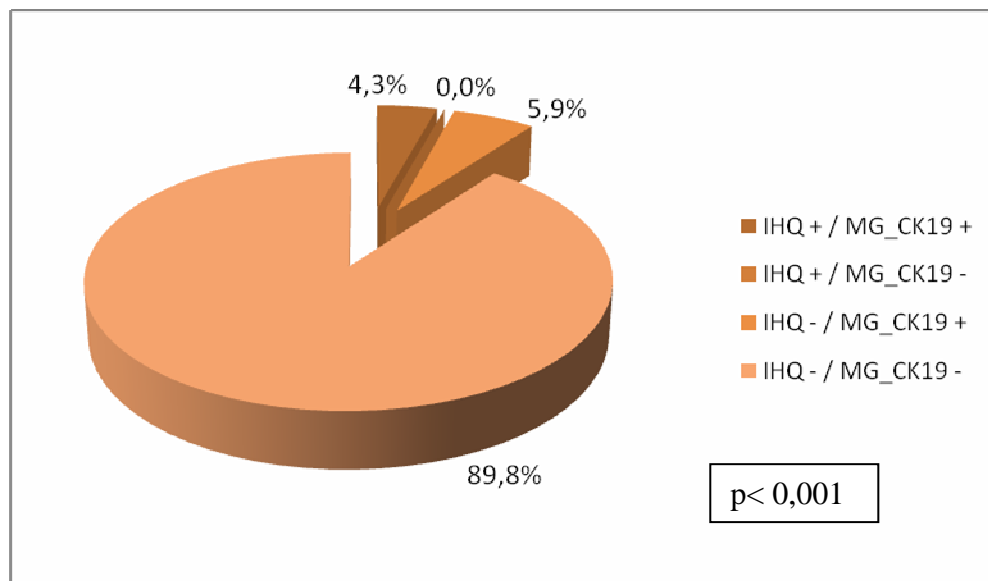


Figura 44: Relación entre el resultado de la Inmunohistoquímica y la variable genética RT-PCR para MG y/o CK19 combinadas.

En el estudio de la relación entre la presencia de MG y CK19 con los antecedentes genésicos de las pacientes, se encontró una relación clínica para la expresión de MG. En aquellas mujeres sin embarazos ni partos, la presencia de MG fue del 23,4%, mientras que la ausencia fue del 76,6%. Respecto a las mujeres con otros antecedentes obstétricos, la presencia de MG fue del 14,7% mientras que la ausencia fue del 85,3% ($p=0,095$). En cuanto a la expresión de CK19 y la de MG y/o CK19, no se pudo establecer ninguna relación significativa ni clínica (CK19 $p=0,408$; MG_CK19 $p=0,134$)(Tabla XXIII).

No se encontró ninguna relación entre los antecedentes familiares de las pacientes y la expresión de los genes objeto de estudio. En la mujeres que presentaron antecedentes familiares de cáncer de mama, la presencia de MG fue del 10,5%, la de CK19 fue del 6,5% y la de MG y/o CK19 fue del 14,5%, mientras que la ausencia de

MG fue del 89,5%, la de CK19 fue del 93,4% y la de ambos marcadores fue del 85,5%. Las pacientes con antecedentes familiares de otros tipos de cáncer presentaron una expresión de MG del 14,6%, una expresión de CK19 de 18,7% y de MG y/o CK19 del 20,8%, mientras que la ausencia de MG fue del 25,4%, la de CK19 del 81,2% y la de los dos marcadores del 79,2%. En cuanto a las pacientes que no presentaron antecedentes familiares de cáncer, la presencia de MG fue del 19,7%, la de CK19 fue del 13,5% y la de MG y/o CK19 fue de 19,7%, mientras que la ausencia de MG fue del 80,3%, la de CK19 fue del 86,5%, y la de ambos marcadores fue del 80,3% (MG $p=0,185$; CK $p=0,118$ y MG_CK19 $p=0,563$). (Tabla XXIII).

Tampoco se encontró ninguna relación entre los antecedentes personales de patología benigna y la expresión de los genes estudiados. En aquellas mujeres que presentaron antecedentes personales de patología mamaria benigna, la presencia de MG fue del 5,9%, igual que la de CK19 y la de ambos MG y/o CK19, mientras que la ausencia de MG fue 94,1%, al igual que la de CK19 y la de MG y/o CK19. Las pacientes cuyos antecedentes personales se debieron a patología benigna en otras localizaciones presentaron una expresión de MG del 11,8%, de CK19 del 5,9% y de MG y/o CK19 del 11,8%, mientras que la ausencia de MG fue del 88,2%, de CK19 fue del 94,5% y de los dos marcadores fue del 88,2%. En cuanto a las pacientes sin antecedentes personales de patologías benignas, la expresión de MG fue del 17,5%, la de CK19 fue del 13,4% y la de MG y/o CK19 fue del 19,8%, mientras que la ausencia de MG fue del 82,5%, la de CK19 del 86,6% y la de los dos marcadores del 80,2% (MG $p=0,172$; CK $p=0,239$ y MG_CK19 $p=0,109$). (Tabla XXIII).

En el análisis de la relación de la expresión de MG y CK19 con el número de GC encontrados, se estableció relación clínica para la CK19 y en el análisis de MG y/o CK19. En las pacientes en las que se encontró un solo GC, la expresión de MG fue del 21,3%, la de CK19 fue del 18,5% y la de ambos marcadores del 25%, mientras que la ausencia de MG fue del 78,7%, la de CK19 fue del 81,5% y la de ambos fue del 75%. Las mujeres en las que se encontraron 2 GC presentaron una expresión de MG del 11,6%, de CK19 del 8,5% y de alguno o ambos marcadores del 13,2%, mientras que la ausencia de MG fue de 88,4%, la de CK19 fue del 91,5% y la de ambos marcadores del 86,8%. Las 65 pacientes restantes en las que se encontraron 3 ó más GC, la presencia de MG fue del 18,5%, la de CK19 del 10,8% y la de MG y/o CK19 fue del 18,5%, mientras que la ausencia de MG fue del 81,5%, la de CK19 fue del 89,2% y la de ambos marcadores del 81,5%. (MG $p=0,214$; CK $p=0,050$ y MG_CK19 $p=0,076$) (Figura 45) (Tabla XXIII).

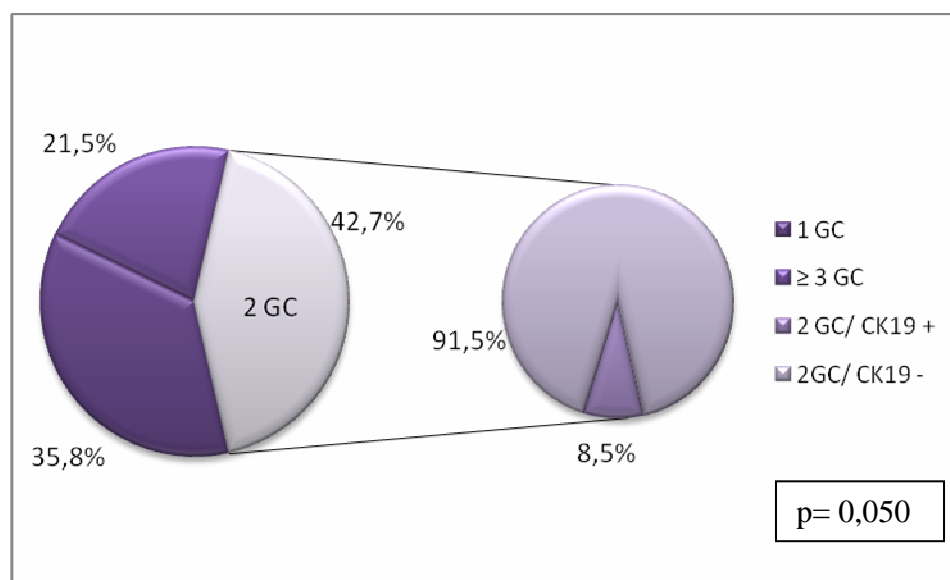


Figura 45: Relación con la variable genética RT-PCR para CK19 en el grupo de pacientes con 2 GC.

Respecto al tamaño de las metástasis ganglionares, se observó relación significativa en la expresión de MG, la expresión de CK19 y en el análisis de MG y/o CK19. En las mujeres en las que el tamaño de la metástasis ganglionar fue ≤ 2 cm, la expresión de MG fue del 44,7%, la de la CK19 del 31,6% y la de MG y/o CK19 del 47,4%, mientras que la ausencia de MG fue del 55,3%, la ausencia de CK19 fue del 68,4% y la del conjunto de ambos marcadores fue del 52,6%. En las pacientes que presentaron tamaño de metástasis ganglionar $> 2,1$ cm, la presencia de MG fue del 77,8%, la de CK19 fue del 61,1% y la de MG y/o CK19 fue del 88,9%, mientras que la ausencia de MG fue del 22,2%, la de CK19 fue del 38,9% y la de los dos marcadores fue del 11,1%. En cuanto a las pacientes en las que se encontraron células tumorales aisladas (CTA), alcanzaron un porcentaje del 100% en la expresión de MG, en la de CK19, así como en la de MG y/o CK19 (MG $p=0,006$; CK $p=0,004$ y MG_CK19 $p=0,002$) (Figuras 46, 47 y 48) (Tabla XXIII). Estos resultados sugieren que cuanto mayor es el tamaño de la metástasis ganglionar, mayor es la expresión de MG y CK19. Además se observa que en los casos de CTA siempre hay expresión de alguno o ambos de los genes estudiados.

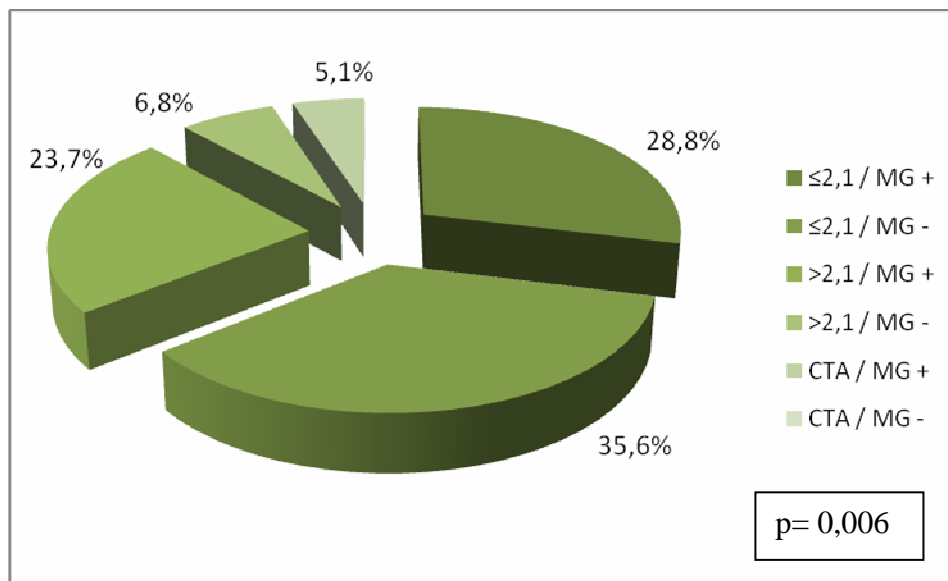


Figura 46: Relación entre el tamaño de las metástasis ganglionares y la variable genética RT-PCR para MG.

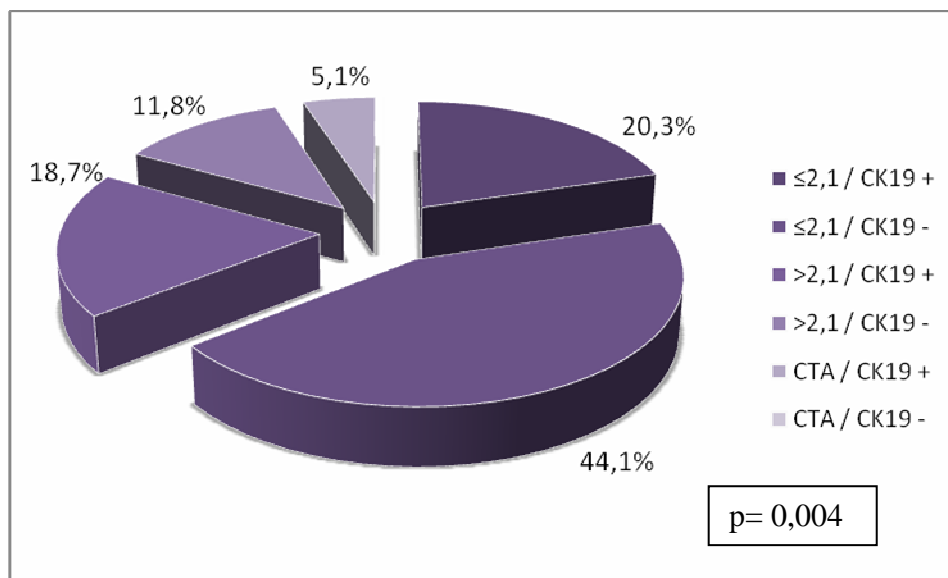


Figura 47: Relación entre el tamaño de las metástasis ganglionares y la variable genética RT-PCR para CK19.

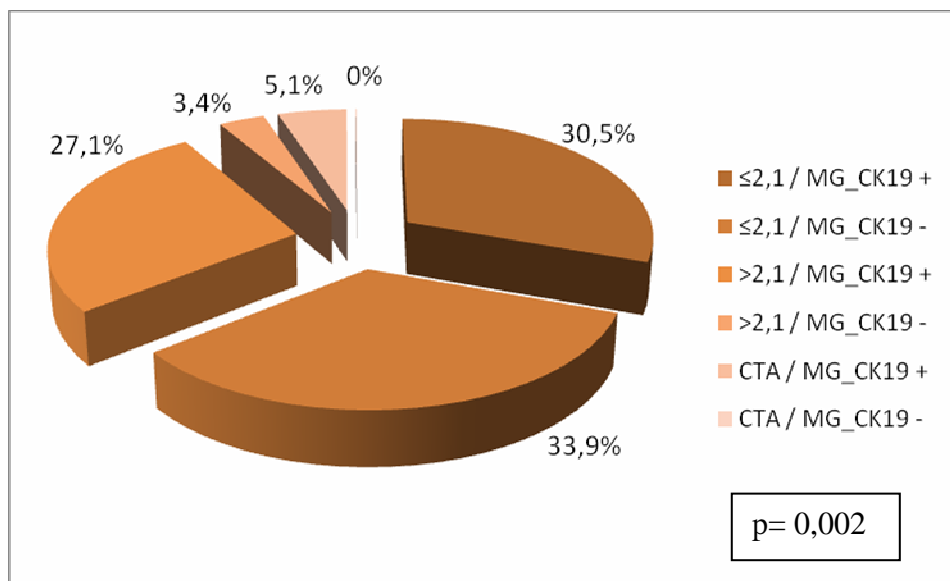


Figura 48: Relación entre el tamaño de las metástasis ganglionares y la variable genética RT-PCR para MG y/o CK19.

En el estudio de la expresión de MG y CK19 en relación a las LFD practicadas o no en las pacientes, se encontró relación significativa para la expresión de MG, la expresión de CK19 y en el análisis conjunto de ambos marcadores. En las pacientes a las que sí se les practicó LFD axilar, la expresión de MG fue del 55,9%, la expresión de CK19 fue del 42,4% y la de MG y/o CK19 fue del 61,1%, mientras que la ausencia de MG fue del 44,1%, la de CK19 fue del 57,6% y la de MG y/o CK19 fue del 38,9%. En las mujeres en las que no se practicó LFD axilar, la presencia de MG alcanzó un 6,9%, la presencia de CK19 un 5,3% y la de MG y/o CK19 un 8,2%, mientras que la ausencia de MG fue del 93,1%, la de CK19 fue del 94,7% y la de ambos marcadores fue del 91,8% (MG $p < 0,001$; CK $p < 0,001$ y MG_CK19 $p < 0,001$) (Figuras 49, 50 y 51) (Tabla XXIII).

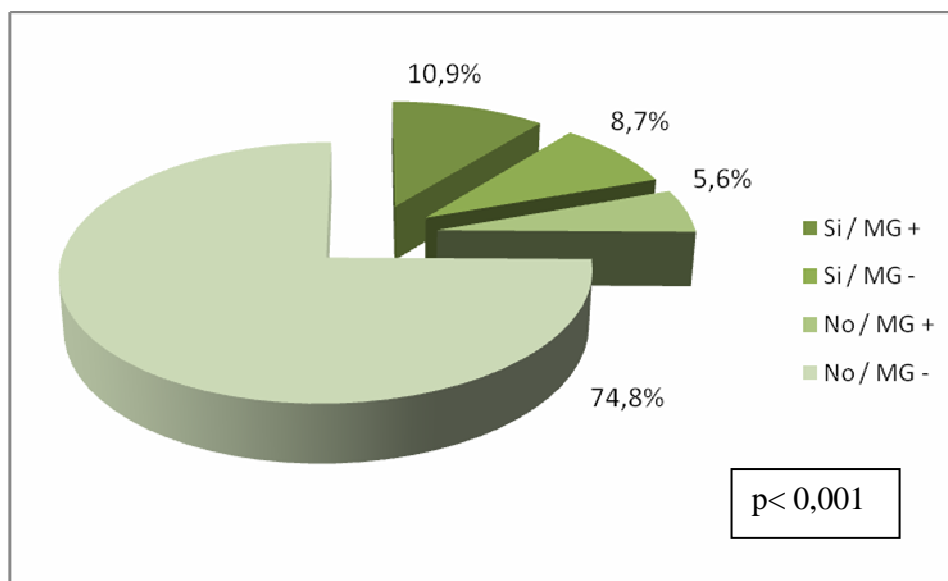


Figura 49: Relación entre las pacientes a las que se les realizó o no linfadenectomía y la variable genética RT-PCR para MG.

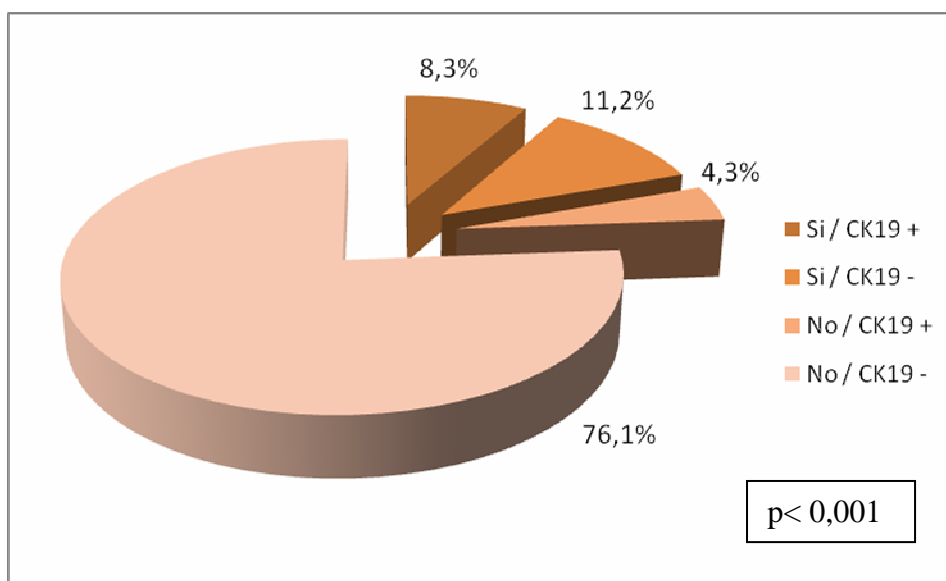


Figura 50: Relación entre las pacientes a las que se les realizó o no linfadenectomía y la variable genética RT-PCR para CK19.

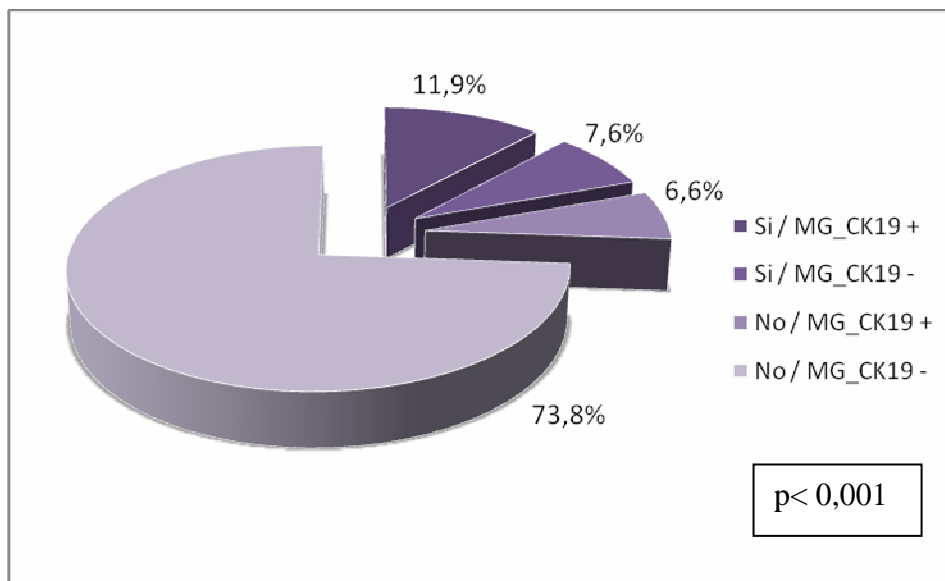


Figura 51: Relación entre las pacientes a las que se les realizó o no linfadenectomía y la variable genética RT-PCR para MG y/o CK19.

Respecto al número de ganglios extraídos en la LFD, se observó relación significativa en la expresión de MG, en la expresión de CK19 y en el análisis conjunto de ambos marcadores. De las 243 pacientes a las que se les extrajeron 0 ganglios en la LFD, el 93,1% presentó ausencia de MG ($p < 0,001$), el 94,7% ausencia de CK19 ($p < 0,001$) y 91,8% ausencia de ambos marcadores ($p < 0,001$). Esto nos indica que cuanto mayor es la probabilidad de encontrar ausencia de estos marcadores, mayor es también la probabilidad de que en la LFD haya que extraer 0 ganglios. En el grupo de mujeres en las que se extrajeron de 16 a 20 ganglios en la LFD, el 100% presentó expresión de MG ($p < 0,001$), así como de MG y/o CK19 ($p < 0,001$), indicando que cuanto mayor es la probabilidad de la expresión de MG o de MG y/o CK19, mayor es también la probabilidad de tener que extraer un número elevado de ganglios en la LFD (Figuras 52, 53 y 54) (Tabla XXIII).

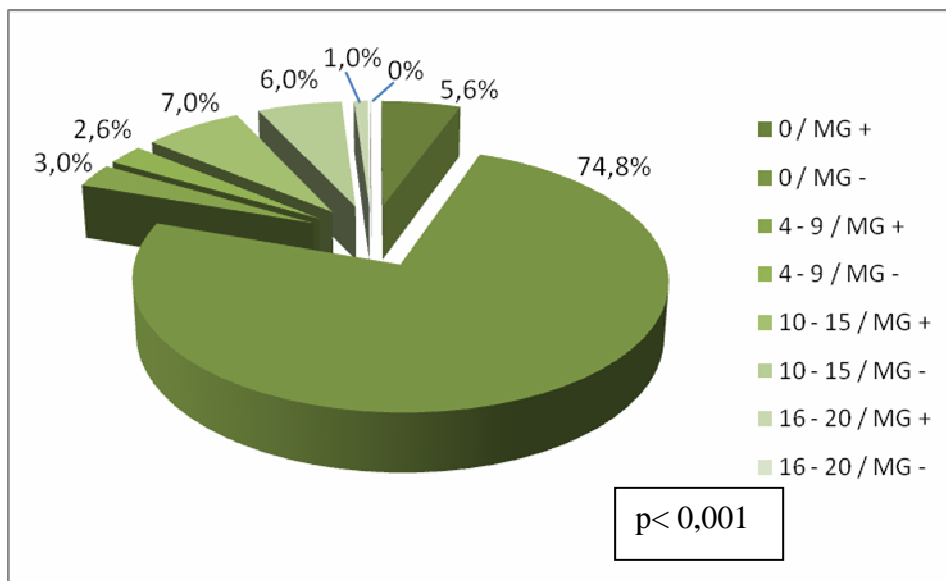


Figura 52: Relación entre el número de ganglios extraídos en la linfadenectomía y la variable genética RT-PCR para MG.

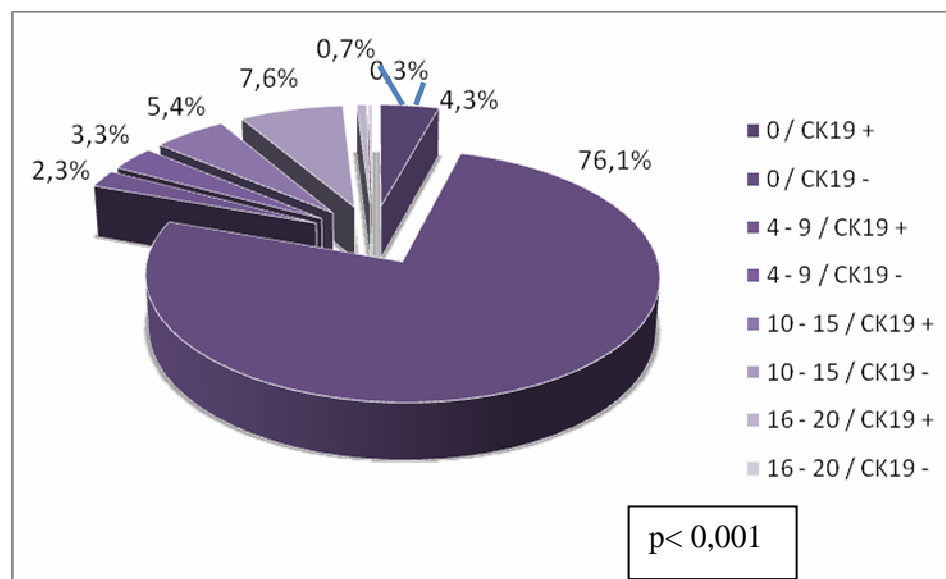


Figura 53: Relación entre el número de ganglios extraídos en la linfadenectomía y la variable genética RT-PCR para CK19.

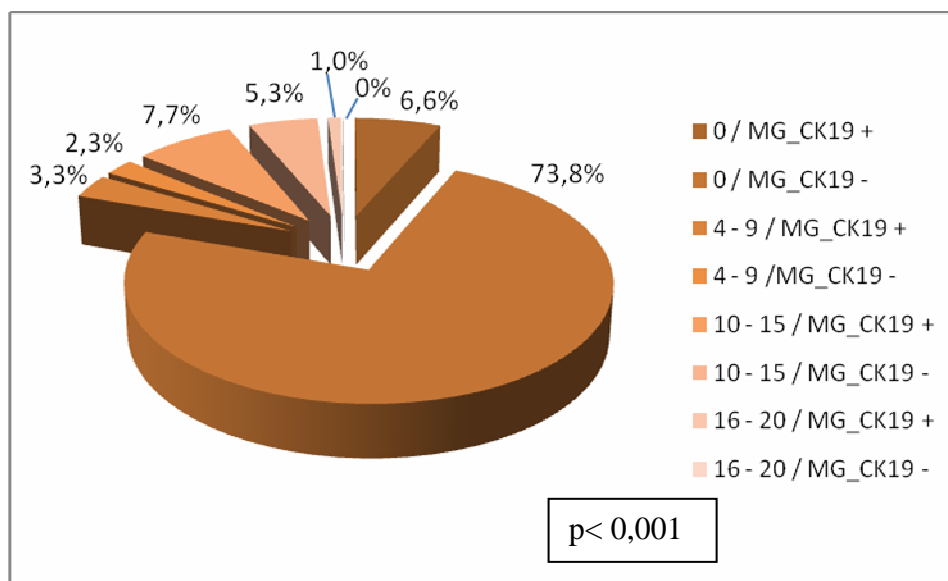


Figura 54: Relación entre el número de ganglios extraídos en la linfadenectomía y la variable genética RT- PCR para MG y/o CK19.

No se encontró ninguna relación entre el número de ganglios positivos extraídos en linfadenectomía y la expresión de los genes objeto de estudio. Las pacientes que presentaron 0 ganglios positivos en LFD, mostraron una expresión de MG del 56,7%, una expresión de CK19 del 43,2% y de MG y/o CK19 del 59,5%, mientras que la ausencia de MG fue del 43,3%, de CK19 del 56,8% y de ambos marcadores del 40,5%. En las pacientes que presentaron de 1 a 3 ganglios positivos en la LFD, un 58,9% presentó expresión de MG, un 47,4% expresión de CK19 y un 68,4% expresión de MG y/o CK19, mientras que el 42,1% presentó ausencia de MG, el 52,6% ausencia de CK19 y el 31,6% ausencia de ambos marcadores. De las mujeres que presentaron de 4 a 6 ganglios positivos en LFD, el 50% presentó expresión de MG, el 0% presentó expresión de CK y el 50% expresó alguno o ambos marcadores a la vez, mientras que presentó ausencia de MG el 50%, ausencia de CK19 el 100% y ausencia de ambos marcadores el 50% (MG $p=0,682$; CK19 $p=0,502$ y MG_CK19 $p=0,988$) (Tabla XXIII).

En el estudio de la relación de la expresión de MG y CK19 con el estadio del tumor primario, se encontró relación significativa para la MG, para la CK19 y en el análisis de MG y/o CK19. En las pacientes en estadio I del tumor primario se observa un 92,7% de ausencia de expresión de MG ($p=0,002$), un 93,6% de ausencia de CK19 ($p<0,001$) y un 90,8% de ausencia de ambos marcadores ($p<0,001$). En las pacientes con tumor primario en estadio IIB se observó una mayor positividad de la expresión de los marcadores (MG 63,6%; CK19 54,5% y MG y/o CK19 63,6%). Estos datos indican que cuanto menor sea la expresión de MG, CK19 y de ambos en conjunto, mayor es la probabilidad de poder clasificar el tumor primario dentro del estadio I (Figuras 55, 56 y 57) (Tabla XXIII).

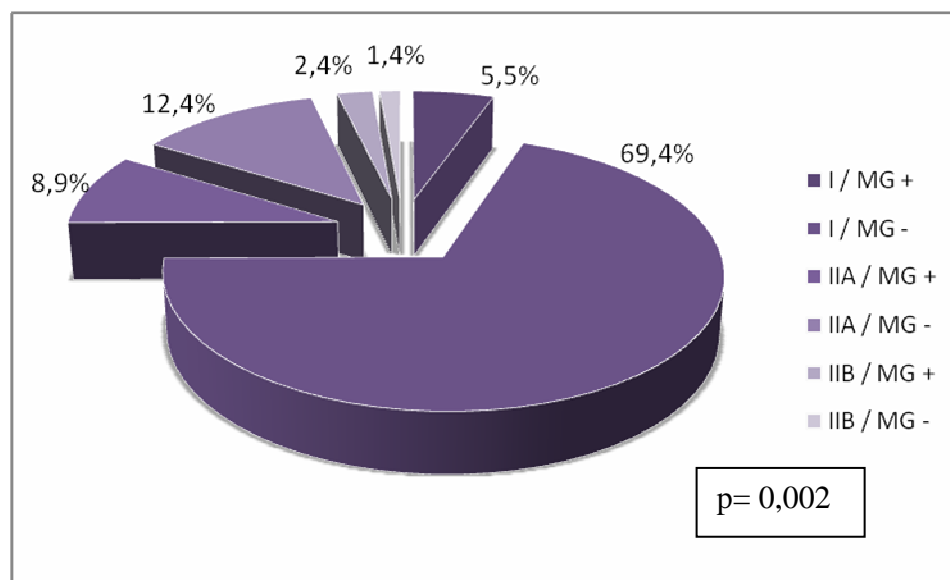


Figura 55: Relación entre el estadio del tumor primario y la variable genética RT-PCR para MG.

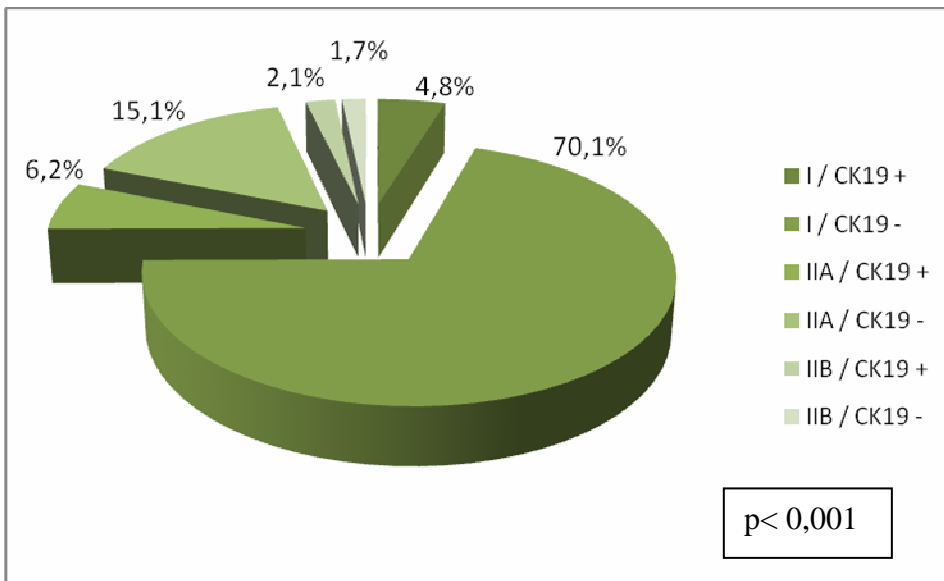


Figura 56: Relación entre el estadio del tumor primario y la variable genética RT- PCR para CK19.

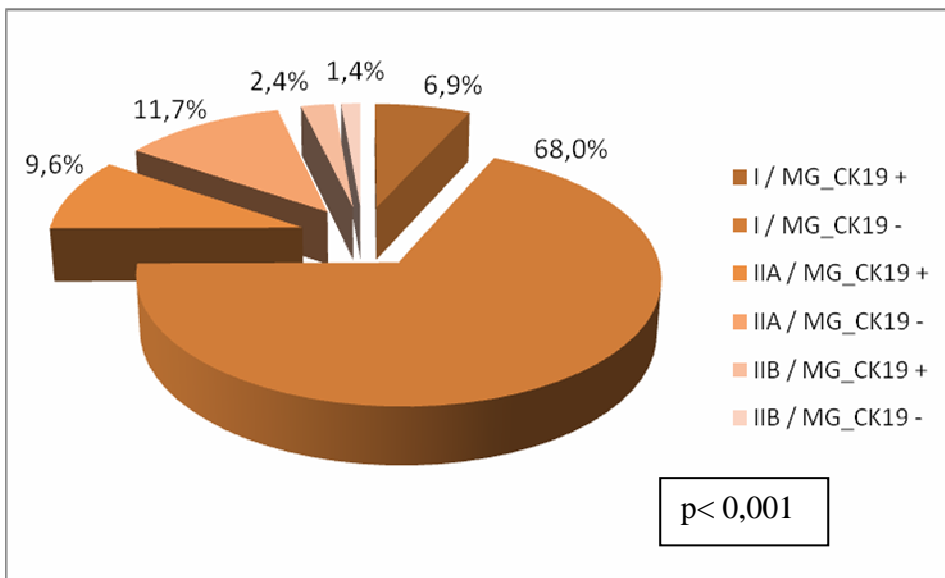


Figura 57: Relación entre el estadio del tumor primario y la variable genética RT-PCR para MG y/o CK19.

Tabla XXIII. Relación entre la expresión de los marcadores MG y CK19 con otros factores estudiados.

Variable	Categorías: recuento (%)	RT-PCR		p	RT-PCR		p	RT-PCR		p
		MG+ (%)	MG- (%)		CK19+ (%)	CK19- (%)		MG y/o CK19+ (%)	MG y/o CK19- (%)	
H&E	Positiva: 47 (15,6)	28 (59,5)	19 (40,4)	<0,001	21 (44,7)	26 (55,3)	<0,001	29 (61,7)	18 (38,3)	<0,001
	Negativa: 255 (84,4)	22 (8,6)	233 (91,4)		17 (6,7)	238 (93,3)		27 (10,6)	228 (89,4)	
IHQ	Positiva: 11 (3,6)	9 (81,8)	2 (18,2)	<0,001	8 (72,2)	3 (27,3)	<0,001	11(100)	0 (0)	<0,001
	Negativa: 243 (80,5)	12 (4,9)	231 (95,1)		9 (3,7)	234 (96,3)		15 (6,2)	228 (93,8)	
	No realizada: 48 (15,9)	29 (60,4)	19 (39,6)		21 (43,7)	27 (56,2)		30 (62,5)	18 (37,5)	
Anteced. genésicos	GOP0: 64 (21,2)	15 (23,4)	49 (76,6)	0,095	10 (15,6)	54 (84,4)	0,408	16 (25)	48 (75)	0,134
	Otros: 238 (78,8)	35 (14,7)	203 (85,3)		28 (11,8)	210 (88,2)		40 (16,8)	198 (83,2)	
Anteced. familiares	Mama: 76 (25,2)	8 (10,5)	68 (89,5)	0,185	5 (6,5)	71 (93,4)	0,118	11 (14,5)	65 (25,5)	0,563
	Otros: 48 (15,9)	7 (14,6)	41 (25,4)		9 (18,7)	39 (81,25)		10 (20,8)	38 (79,2)	
	No: 178 (58,9)	35 (19,7)	143 (80,3)		24 (13,5)	154 (86,5)		35 (19,7)	143 (80,3)	
Anteced. personales	Mama: 17 (5,6)	1 (5,9)	16 (94,1)	0,172	1 (5,9)	16 (94,1)	0,239	1 (5,9)	16 (94,1)	0,109
	Otros: 17 (5,6)	2 (11,8)	15 (88,2)		1 (5,9)	16 (94,5)		2 (11,8)	15 (88,2)	
	No: 268 (88,7)	47 (17,5)	221 (82,5)		36 (13,4)	232 (86,6)		53 (19,8)	215 (80,2)	
Nº de ganglios centinela	1: 108 (35,8)	23 (21,3)	85 (78,7)	0,214	20 (18,5)	88 (81,5)	0,050	27 (25)	81 (75)	0,076
	2: 129 (42,7)	15 (11,6)	114 (88,4)		11 (8,5)	118 (91,5)		17 (13,2)	112 (86,8)	
	≥3: 65 (21,5)	12 (18,5)	53 (81,5)		7 (10,8)	58 (89,2)		12 (18,5)	53 (81,5)	
Tamaño metástasis en ganglio	≤2: 38 (64,4)	17 (44,7)	21 (55,3)	0,006	12 (31,6)	26 (68,4)	0,004	18 (47,4)	20 (52,6)	0,002
	>2,1: 18 (30,5)	14 (77,8)	4 (22,2)		11 (61,1)	7 (38,9)		16 (88,9)	2 (11,1)	
	CTA: 3 (5,1)	3 (100)	0 (0)		3 (100)	0 (0)		3 (100)	0 (0)	
LFD	Si: 59 (19,5)	33 (55,9)	26 (44,1)	<0,001	25 (42,4)	34 (57,6)	<0,001	36 (61,1)	23 (38,9)	<0,001
	No: 243 (80,5)	17 (6,9)	226 (93,1)		13 (5,3)	230 (94,7)		20 (8,2)	223 (91,8)	
Ganglios extraídos en LFD	0: 243 (80,5)	17 (6,9)	226 (93,1)	<0,001	13 (5,3)	230 (94,7)	<0,001	20 (8,2)	223 (91,8)	<0,001
	1 - 3: -	-	-		-	-		-	-	
	4 - 9: 17 (5,6)	9 (52,9)	8 (47,1)		7 (41,1)	10 (58,9)		10 (58,9)	7 (41,1)	
	10 - 15: 39 (12,9)	21 (53,8)	18 (46,1)		16 (41,1)	23 (58,9)		23 (58,9)	16 (41,1)	
16 - 20: 3 (1,0)	3 (100)	0 (0)	2 (66,7)	1 (33,3)	3 (100)	0 (0)				
Ganglios + en LFD	0: 37 (63,8)	21 (56,7)	16 (43,3)	0,682	16 (43,2)	21 (56,8)	0,502	22 (59,5)	15 (40,5)	0,988
	1 - 3: 19 (32,8)	11 (58,9)	8 (42,1)		9 (47,4)	10 (52,6)		13 (68,4)	6 (31,6)	
	4 - 6: 2 (3,4)	1 (50)	1 (50)		0 (0)	2 (100)		1 (50)	1 (50)	
Estadio	I: 218 (72,2)	16 (7,3)	202 (92,7)	0,002	14 (6,4)	204 (93,6)	<0,001	20 (9,2)	198 (90,8)	<0,001
	IIA:62(20,5)	26 (41,9)	36 (58,1)		18 (29,0)	44 (71,0)		28 (45,2)	34 (54,8)	
	IIB:11 (3,6)	7 (63,6)	4 (36,4)		6 (54,5)	5 (45,5)		7 (63,6)	4 (36,4)	

VI. ANÁLISIS DE LA FRECUENCIA Y ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE LAS VARIABLES GENÉTICAS

La técnica de RT-PCR convencional se realizó en las 302 pacientes incluidas en el estudio. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla XXIV.

Se encontraron 50 pacientes (16,6%) con resultado positivo y 252 (83,4%) con resultado negativo en la RT-PCR para la determinación de MG.

Con respecto a la RT-PCR para la determinación de CK19, hubo 38 pacientes (12,6%) con resultado positivo y 264 (87,4%) con resultado negativo.

En el estudio de ambos marcadores en conjunto se encontraron 56 pacientes (18,5%) con resultado positivo y 246 pacientes con resultado negativo.

Tabla XXIV: Resultados obtenidos por la técnica de RT-PCR convencional para la determinación de los marcadores genéticos MG, CK19 y los dos en conjunto.

		N (302)	%
RT-PCR MG	Positiva	50	16,5
	Negativa	252	83,4
RT-PCR CK19	Positiva	38	12,6
	Negativa	264	87,4
RT-PCR MG y/o CK19	Positiva	56	18,5
	Negativa	246	81,5

Se estudió la relación entre los marcadores MG y CK19 determinados por RT-PCR convencional.

Analizando las pacientes a las que se les realizó la técnica de RT-PCR convencional para la determinación de MG, se observa que, de las que tuvieron resultado positivo, el 97,6% tuvo también resultado positivo para CK19 y el 2,4% presentó resultado negativo para CK19.

En el grupo de las pacientes a las que se les realizó la técnica de RT-PCR convencional para la determinación de MG, se observa que, de las que tuvieron resultado negativo, el 36% tuvo resultado positivo para CK19 y el 64% presentó resultado negativo para CK19.

En el conjunto de las pacientes a las que se les realizó la técnica de RT-PCR convencional para la determinación de CK19, se observa que el 93,2% tuvieron resultado positivo para MG y para CK19 y que el 15,8% tuvieron resultado positivo para MG pero negativo para CK19. Se observa también que el 6,8% tuvieron resultado negativo para MG pero positivo para CK19 y que el 84,2% presentó resultado negativo para MG y también negativo para CK19 (Tabla XXV).

Se confirma una muy buena fiabilidad en la correlación de resultados entre los distintos marcadores utilizados, a través de un índice Kappa de 0,682.

Tabla XXV. Relación entre MG y CK19 determinadas con RT-PCR convencional

RT-PCR MG		RT-PCR CK19		Kappa
		Positiva (%)	Negativa (%)	
Positiva	% dentro de RT-PCR MG	97,6	2,4	0,682
	% dentro de RT-PCR CK19	93,2	15,8	
Negativa	% dentro de RT-PCR MG	36	64	
	% dentro de RT-PCR CK19	6,8	84,2	

VII. SEGUIMIENTO POSTOPERATORIO DE LAS PACIENTES DE CARCINOMA DE MAMA EN ESTADIOS TEMPRANOS. ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA PRONÓSTICA: SUPERVIVENCIA GLOBAL

VII.A. Estudio de la supervivencia global

En el estudio de la SG se consideraron como eventos las pacientes que fallecieron a consecuencia del tumor. En el momento de realizar este análisis habían fallecido 25 pacientes (8,3%) debido a su enfermedad tumoral.

La mediana del tiempo de seguimiento fue de 72 meses (con un rango intercuartílico $P_{25}=52$ meses y $P_{75}=76$ meses). Todos los análisis con respecto a la SG se han realizado en referencia a la mediana del tiempo de seguimiento

La SG acumulada de las pacientes a los 72 meses fue del 95,5% (Figura 58).

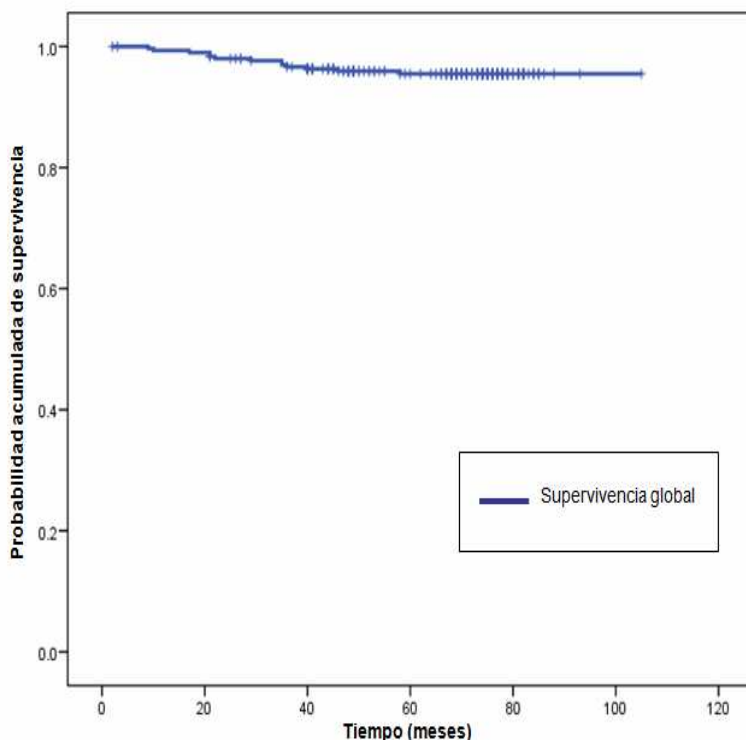


Figura 58: Curva de la supervivencia global acumulada de las pacientes con cáncer de mama.

VII.B. Análisis univariable de la probabilidad acumulada de fallecer de las pacientes con cáncer de mama en estadios iniciales en relación con la técnica de biología molecular empleada: RT-PCR convencional

Se estudió la relación de la técnica de RT-PCR convencional con la SG de las pacientes (Tabla XXVI).

La técnica de RT-PCR no presentó significación pronóstica respecto a la SG a los 72 meses, ni para la MG, ni para la CK19, ni considerando el análisis combinado de los marcadores. Sin embargo, sí que se observan unas HR en torno a 2 cuando la RT-PCR es positiva para MG y cuando es positiva para MG y/o CK19, por lo que la SG en estas pacientes es menor.

Tabla XXVI. Análisis univariable de la supervivencia global en relación con la técnica de biología molecular empleada: RT-PCR convencional.

Variable	Categorías	SG (72m)	EE	HR*	IC 95%	p
RT-PCR MG	Positiva	91,90%	0,039	2,18	0,6-7,0	0,22
	Negativa	96,20%	0,012	1		
RT-PCR CK19	Positiva	94,70%	0,036	1,24	0,2-5,6	0,787
	Negativa	95,60%	0,013	1		
RT-PCR MG y/o CK19	Positiva	92,80%	0,035	1,89	0,6-6,1	0,311
	Negativa	96,10%	0,013	1		

IC95%: intervalo de confianza 95%. EE: error estándar. Significación estadística: $p < 0,05$.

*Los HR están ajustados por todas las variables de la tabla.

VII.C. Análisis univariable de la probabilidad acumulada de fallecer de las pacientes con cáncer de mama en estadios iniciales en relación con los factores pronóstico clásicos

Se estudió la relación de los factores pronóstico clásicos con la SG de las pacientes a los 72 meses de seguimiento (Tabla XXVII).

En el estudio de la relación entre la afectación ganglionar y la SG, no se encontraron relaciones estadísticamente significativas. La SG en las pacientes que mostraron afectación ganglionar fue del 95,8%, mientras que en las pacientes sin afectación ganglionar la SG fue del 95,4%.

Tampoco se encontró ninguna relación pronóstica entre el tamaño del tumor primario y la SG. En el grupo de pacientes en el que el tamaño del tumor estaba comprendido entre 0,1 y 2cm, la SG fue del 95,4%. La SG fue del 95,1% en el grupo de pacientes con un tamaño de tumor primario comprendido entre 2,1 y 3cm.

Respecto al grado tumoral no se encontró ninguna relación significativa con la SG. Las pacientes con grado tumoral I presentaron una SG del 97,4%. Las pacientes con

grado tumoral II mostraron una SG del 96,0%. Una SG del 91,3% alcanzaron las pacientes con grado tumoral III.

De la misma manera, la relación entre el tipo histológico del tumor primario y la SG tampoco resultó significativa. Las mujeres cuyo tumor primario fue de tipo histológico ductal tuvieron una SG del 94,4%. En el caso de los tumores primarios de tipo lobulillar, la SG fue del 96,9%.

Tabla XXVII. Análisis univariable de la supervivencia global en relación con los factores pronóstico clásicos.

Variable	Categorías	SG (72m)	EE	HR*	IC 95%	p
Afectación ganglionar	Si	95,80%	0,029	0,94	0,21-4,26	0,941
	No	95,40%	0,013	1		
Tamaño tumor primario	0,1 - 2 cm	95,40%	0,014	1		0,962
	2,1 - 3 cm	95,10%	0,034	1,07	0,23-4,84	
Grado tumoral	I	97,40%	0,018	1		0,394
	II	96,00%	0,016	1,44	0,3-7,2	
	III	91,30%	0,037	3,35	0,6-17,3	
Tipo histológico	Ductal	94,40%	0,017	1		0,635
	Lobulillar	96,90%	0,021	0,538	0,1-2,4	

IC95%: intervalo de confianza 95%. EE: error estándar. Significación estadística: $p < 0,05$. *Los HR están ajustados por todas las variables de la tabla.

VII.D. Análisis univariable de la probabilidad acumulada de fallecer de las pacientes con cáncer de mama en estadios iniciales en relación con los factores pronóstico biológicos

Se analizó la relación de los factores pronóstico biológicos con la SG de las pacientes a los 72 meses de seguimiento (Tabla XXVIII).

En el estudio de la relación entre la SG y la presencia de los receptores de estrógenos se encontró una asociación clínica. La SG de las pacientes con receptores de estrógenos positivos fue del 96,6%, mientras que en aquellas que no presentaban receptores de estrógenos la SG fue del 89,7% (HR= 0,321) (p= 0,061) (Figura 59) (Tabla XXVIII).

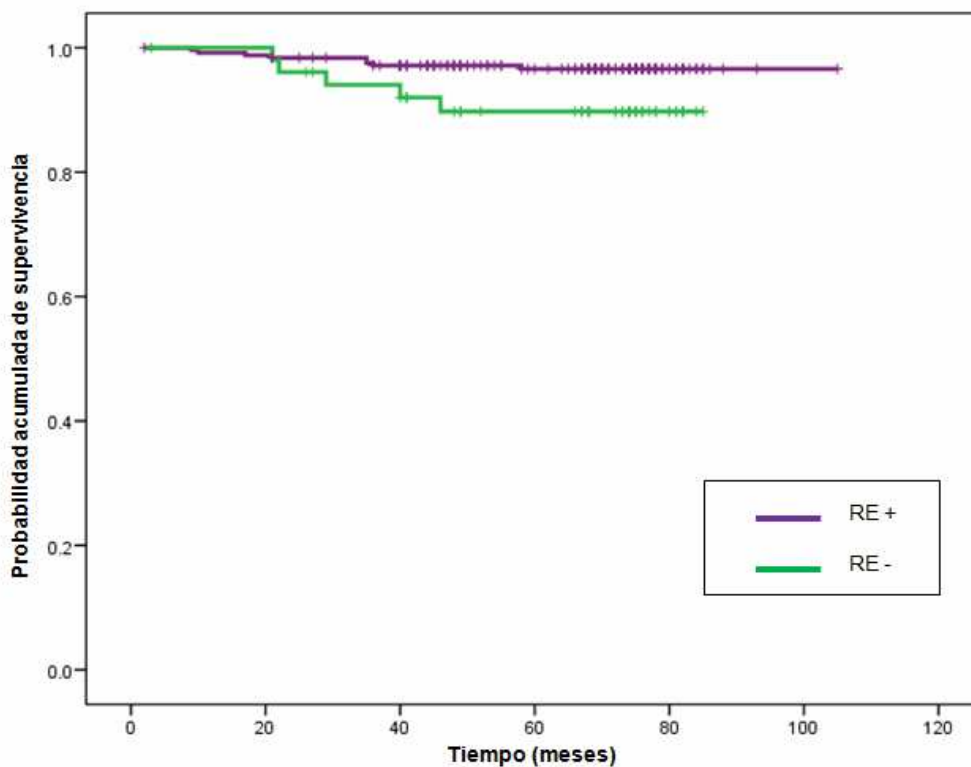


Figura 59. Curva de supervivencia global acumulada de las pacientes según los receptores de estrógenos.

En el análisis de la relación de la SG con la presencia de los receptores de progesterona, no se encontró significación pronóstica (Tabla XXVIII).

Se estableció una asociación estadísticamente significativa entre la SG y el marcador de proliferación Ki67. En el grupo de pacientes con un índice de proliferación menor o igual al 5%, la SG fue del 95,8%. En el grupo de mujeres con un Ki67 en el rango entre el 6% y el 50%, la SG fue del 98,4%. En el grupo de pacientes en las que el índice de proliferación fue mayor o igual al 51%, la SG disminuyó al 86,1% ($p= 0,012$). Podemos afirmar que el índice de proliferación Ki67 es un factor de mal pronóstico con respecto de la SG. (Figura 60) (Tabla XXVIII).

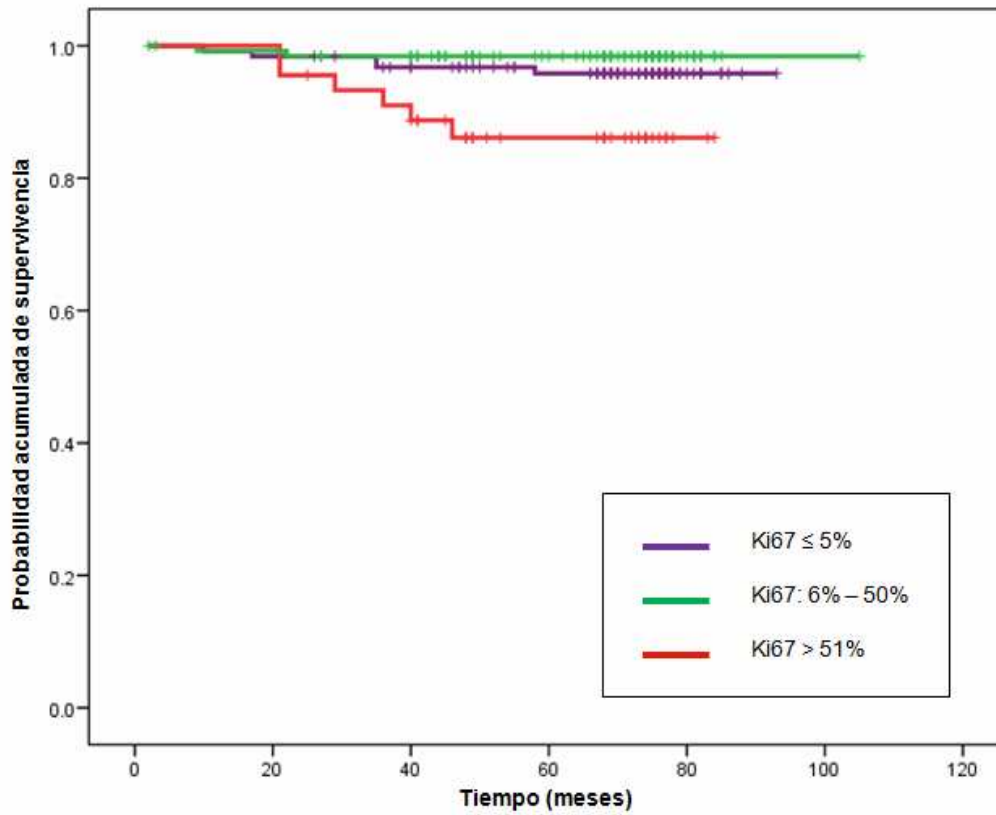


Figura 60. Curva de supervivencia global acumulada de las pacientes según el índice de proliferación Ki67.

En el análisis de la relación de la SG con la expresión del gen HER2neu, no se encontró significación pronóstica (Tabla XXVIII).

Tabla XXVIII: Análisis univariable de la supervivencia global en relación con los factores pronóstico biológicos.

Variable	Categorías	SG (72m)	EE	HR*	IC 95%	p
Receptores de estrógenos	Positivo	96,60%	0,012	0,321	0,1-0,9	0,061
	Negativo	89,70%	0,044	1		
Receptores de progesterona	Positivo	94,90%	0,015	1,798	0,4-8,1	0,415
	Negativo	97,10%	0,02	1		
Ki67	≤ 5%	95,80%	0,018	0,281	0,0-0,9	0,012
	6% - 50%	98,40%	0,011	0,112	0,0-0,5	
	≥ 51%	86,10%	0,053	1		
Her2neu	Positivo	97,30%	0,027	0,589	0,0-4,5	0,583
	Negativo	95,20%	0,014	1		

IC95%: intervalo de confianza 95%. EE: error estándar. Significación estadística: $p \leq 0,05$. *Los HR están ajustados por todas las variables de la tabla.

VII.E. Análisis univariable de la probabilidad acumulada de fallecer de las pacientes con cáncer de mama en estadios iniciales en relación con otros factores estudiados

En el análisis de la relación entre la SG y los resultados obtenidos mediante la técnica de hematosilina-eosina, no se encontró significación pronóstica. La SG de las pacientes con H&E positiva fue del 95,70% y la SG de las pacientes con H&E negativa fue del 95,5% (Tabla XXIX).

Tampoco se encontró relación significativa entre la SG y los resultados de la técnica de tinción inmunohistoquímica. Las mujeres con IHQ positiva presentaron una SG del 90,9%. En las mujeres que presentaron IHQ negativa, la SG fue del 95,6% (Tabla XXIX).

Igualmente, no se pudo establecer significación pronóstica entre la SG y los antecedentes genésicos de las pacientes. Aquellas pacientes sin antecedentes genésicos presentaron una SG del 94,8%. En las que presentaron cualquier tipo de antecedente genésico, la SG fue del 95,6% (Tabla XXIX).

En el análisis de la relación entre la SG y los antecedentes familiares de patología tumoral que presentaron las pacientes, no se encontró significación pronóstica (Tabla XXIX).

Respecto a los antecedentes personales de patología benigna de las pacientes, se encontró asociación estadísticamente significativa con la SG. La HR (*Hazard Ratio* o razón de riesgos) de fallecer de las pacientes con antecedentes personales de patología mamaria benigna fue 8,71 veces mayor que en las pacientes con antecedentes personales de patología benigna en otras localizaciones y que en las pacientes sin antecedentes personales de patología benigna ($p= 0,011$) (Figura 61) (Tabla XXIX).

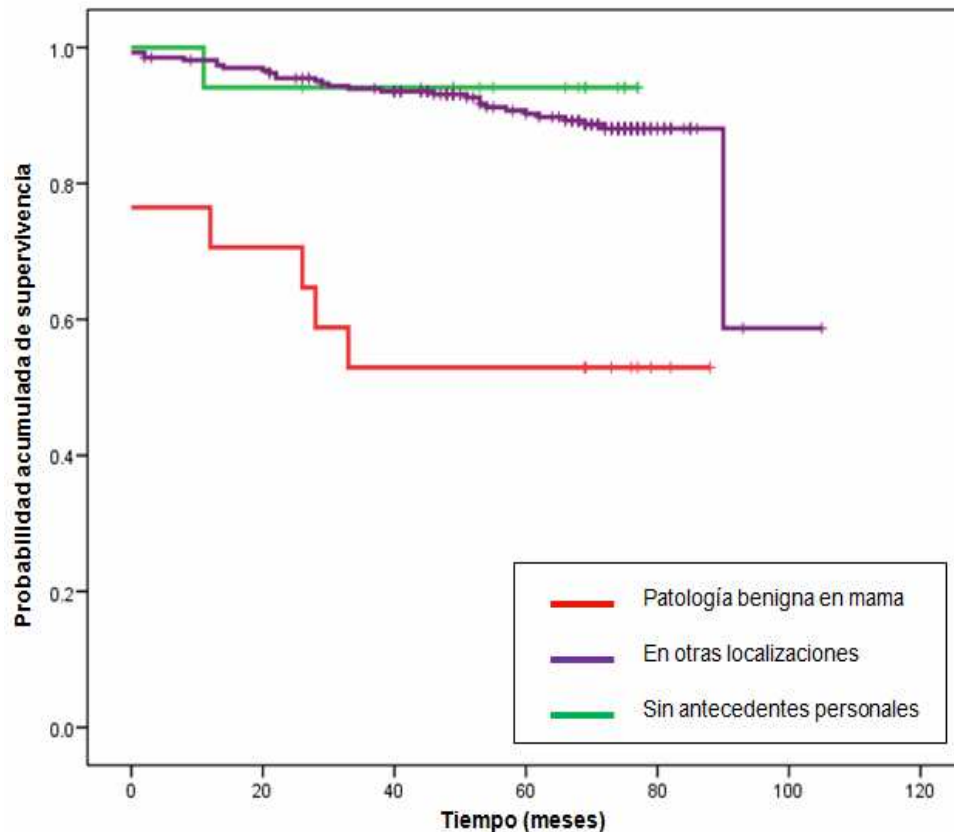


Figura 61. Curva de supervivencia global acumulada de las pacientes según sus antecedentes personales de patología benigna.

En cuanto al número de ganglios centinela encontrados en la cirugía, no se encontró significación pronóstica respecto a la SG, siendo de 94,3%; 95,8% y 95,8% la SG para 1 GC, 2GC o 3 ó más GC, respectivamente (Tabla XXIX).

No se encontró ninguna significación pronóstica entre el tamaño de las metástasis y la SG; el que se realizara o no una linfadenectomía a las pacientes; el número de ganglios extraídos en la linfadenectomía; ni el número de ganglios positivos de entre los extraídos en la linfadenectomía.

En el análisis del estadio del tumor primario en relación a la SG, no se encontró significación pronóstica. La SG en estadio I fue del 94,7%; en estadio IIA fue del 98,3% y en estadio IIB del 90,9% (Tabla XXIX).

Tabla XXIX. Análisis univariable de la supervivencia global en relación con otros factores estudiados.

Variable	Categorías	SG (72m)	EE	HR*	IC 95%	p
H&E	Positiva	95,70%	0,029	0,97	0,2-4,4	0,969
	Negativa	95,50%	0,013	1		
IHQ	Positiva	90,90%	0,087	2,22	0,28-17,4	0,494
	Negativa	95,60%	0,014	1		
Antecedentes genésicos	GPO	94,80%	0,029	1,13	0,3-4,1	0,855
	Otros	95,60%	0,014	1		
Antecedentes familiares	Mama	98,60%	0,014	0,203	0,0-1,6	0,113
	Otros	97,90%	0,021	0,34	0,0-2,6	
	No	93,50%	0,019	1		
Antecedentes personales	Mama	76,50%	0,103	8,71	2,6-28,9	0,011
	Otros	94,10%	0,057	2,08	0,3-16,7	
	No	96,80%	0,011	1		
Nº de ganglios centinela	1	94,30%	0,023	1		0,682
	2	95,80%	0,018	0,685	0,2-2,2	
	≥3	95,80%	0,022	0,53	0,1-2,6	
Tamaño de las metástasis ganglionares	≤2	---	---	1		-
	>2,1	88,90%	0,074	233,894	Indeterminado	
LFD	Si	96,60%	0,024	0,73	0,2-3,3	0,67
	No	95,20%	0,014	1		
Ganglios extraídos en la LFD	0	95,20%	0,014			0,574
	4 - 9	94,10%	0,057			
	10 - 15	97,40%	0,025	0,859	0,4-1,5	
Ganglios + en LFD	0	97,30%	0,027	0,822	0,19-3,48	0,773
	1 - 3	88,9	0,105	1		
Estadio	I	94,70%	0,016	1,85	0,2-14,34	0,369
	IIA	98,30%	0,017	0,31	0,0-2,43	
	IIB	90,90%	0,087	1		

IC95%: intervalo de confianza 95%. EE: error estándar. Significación estadística: $p < 0,05$. *Los HR están ajustados por todas las variables de la tabla.

VII.F. Análisis multivariable de la supervivencia global

Una vez establecidos los factores que influyen en la SG analizamos la importancia relativa de esos factores, valorada con el modelo de regresión de Cox. Este análisis multivariable permite establecer cuáles de los factores relacionados con la SG presentan valor pronóstico independiente. En este modelo se incluyeron la variable antecedentes personales de patología benigna, la presencia de receptores de estrógenos y el índice de proliferación Ki67.

Las variables que presentaron valor pronóstico independiente en el riesgo de fallecer de las pacientes de cáncer de mama fueron la presencia de antecedentes personales ($p=0,010$) y la presencia de receptores de estrógenos ($p=0,004$).

La probabilidad de fallecer de las pacientes con antecedentes personales de patología benigna mamaria fue 4,1 veces superior a la de las pacientes con antecedentes de patología benigna en otras localizaciones o sin antecedentes de patología benigna ($HR=4,14$; $IC95\%=1,40-12,25$) ($p=0,010$).

Con respecto a los receptores de estrógenos, se observa una reducción de riesgo en la probabilidad de fallecer de las pacientes con presencia de RE, con una HR de 0,24 ($IC95\%=0,09-0,64$) ($p=0,004$).

En el caso del índice de proliferación Ki67, no se encontraron resultados estadísticamente significativos.

Los marcadores objeto de este estudio, MG y CK19, no se incluyeron en este análisis ya que no presentaron asociación significativa en relación a la SG.

VIII. SEGUIMIENTO POSTOPERATORIO DE LAS PACIENTES DE CARCINOMA DE MAMA EN ESTADIOS TEMPRANOS. ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA PRONÓSTICA: SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD

VIII.A. Estudio de la supervivencia libre de enfermedad

La SLE fue calculada como el tiempo transcurrido entre la fecha de la cirugía y la fecha del diagnóstico de la primera recurrencia.

La mediana del tiempo de seguimiento fue de 72 meses (rango intercuartílico P25= 58 meses y P75= 76 meses). Todos los análisis de la SLE quedan referidos a la mediana del tiempo de seguimiento.

La SLE de las pacientes a los 72 meses fue del 86,4% (IC95%: 83,14 - 98,13) (Figura 62)

En 38 pacientes se diagnosticó recurrencia del tumor; 19 locorreregionales y otras 19 a distancia.

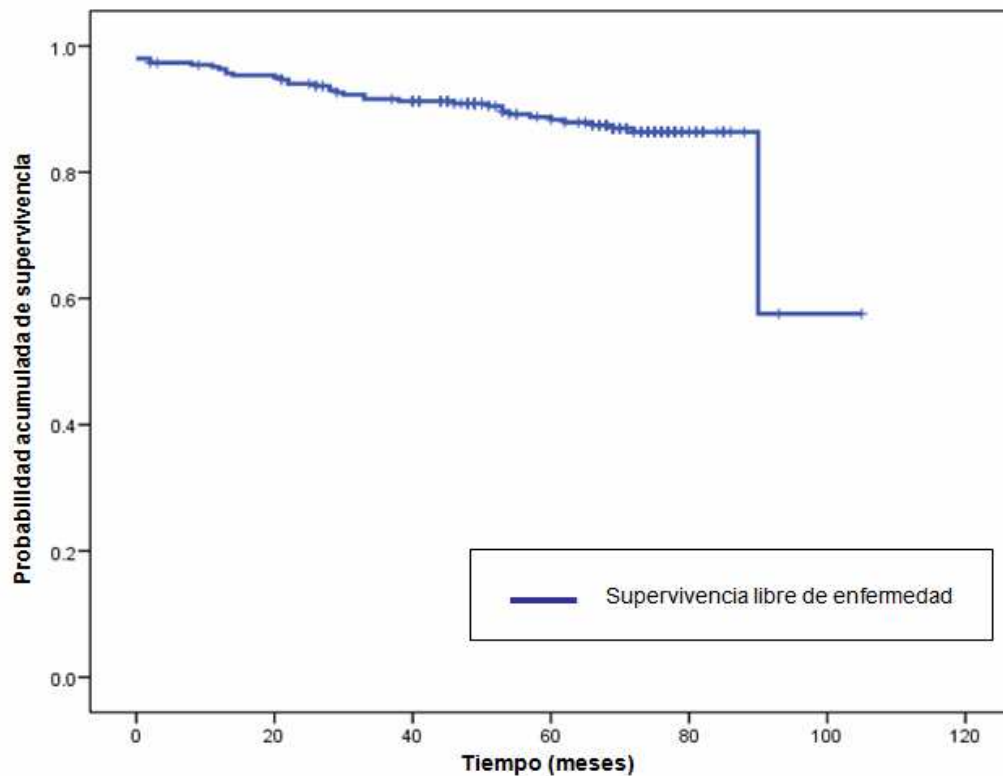


Figura 62. Curva de la supervivencia libre de enfermedad acumulada de las pacientes con cáncer de mama.

VIII.B. Análisis univariable de la probabilidad acumulada de recidivar de las pacientes con cáncer de mama en estadios iniciales en relación con la técnica de biología molecular empleada: RT-PCR convencional

Se estudió la relación de la técnica de RT-PCR convencional con la SLE de las pacientes (Tabla XXX).

La técnica de RT-PCR no presentó significación pronóstica respecto a la SLE, ni para la MG, ni para la CK19, ni considerando la combinación de ambos marcadores. Sin embargo, cuando los resultados son positivos en la RT-PCR para MG, para CK19 y

para MG y/o CK19 combinados, se aprecia una disminución de la SLE, asociada a unas HR próximas a 2 en los tres casos.

Teniendo en cuenta que las pacientes de nuestro estudio presentan estadios tempranos del tumor primario, tanto en la SLE como en la SG se podrían conseguir significaciones estadísticas con respecto a los marcadores estudiados, ampliando suficientemente el tiempo de seguimiento.

Tabla XXX. Análisis univariable de la supervivencia libre de enfermedad en relación con la técnica de biología molecular empleada: RT-PCR convencional.

Variable	Categorías	SLE (72m)	EE	HR*	IC 95%	p
RT-PCR MG	Positiva	81,40%	0,056	1,706	0,8-3,5	0,147
	Negativa	88,00%	0,022	1		
RT-PCR CK19	Positiva	81,10%	0,065	1,824	0,8-3,9	0,131
	Negativa	87,70%	0,021	1		
RT-PCR MG y/o CK19	Positiva	81,60%	0,053	1,699	0,8-3,4	0,139
	Negativa	88,10%	0,022	1		

IC95%: intervalo de confianza 95%. EE: error estándar. Significación estadística: $p < 0,05$. *Los HR están ajustados por todas las variables de la tabla.

VIII.C. Análisis univariable de la probabilidad acumulada de recaer en las pacientes con cáncer de mama en estadios iniciales en relación con los factores pronóstico clásicos

En el estudio de la relación entre la SLE y la afectación ganglionar no se encontró asociación estadísticamente significativa. Tampoco se pudo establecer ninguna asociación clínica (Tabla XXXI).

No se encontró ninguna relación entre la SLE y el tamaño del tumor primario. La SLE de las pacientes con tamaño del tumor primario entre 0,1 y 2cm fue del 87,1%. En el grupo comprendido entre 2,1 y 3cm, la SLE fue del 79,0% (Tabla XXXI).

En el análisis de la variable grado tumoral en relación a la SLE, se encontró asociación estadísticamente significativa. El riesgo de recidivar de las pacientes con tumor primario de grado tumoral III fue 2,3 veces mayor que en las pacientes con tumores primarios de grado I y II (HR=2,39, IC95%=1,0-5,7) (p= 0,048) (Figura 63) (Tabla XXXI).

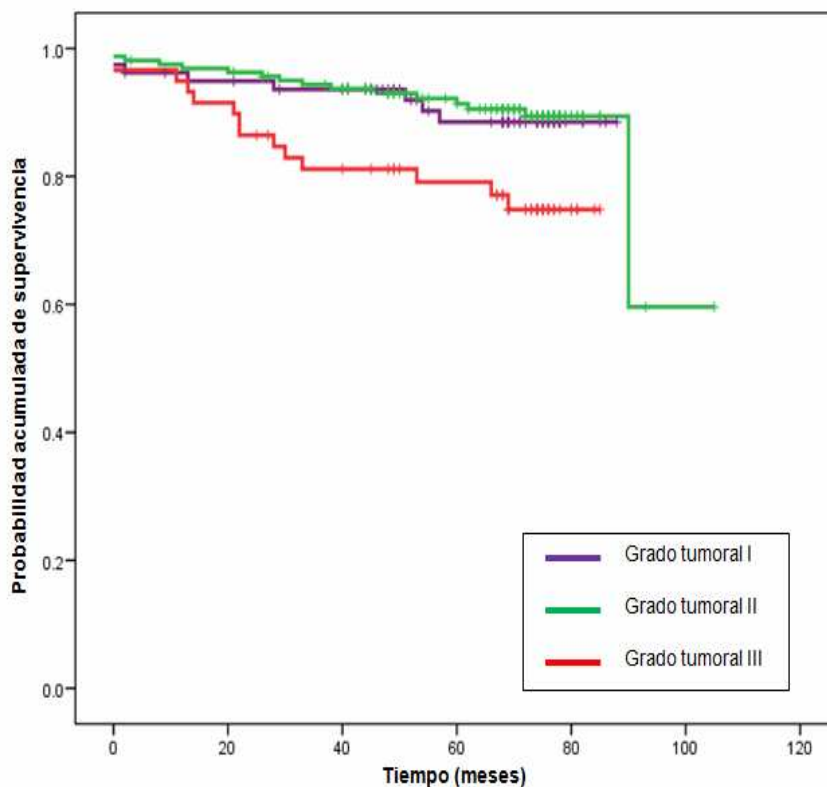


Figura 63. Curva de la supervivencia libre de enfermedad acumulada de las pacientes según el grado del tumor primario.

Con respecto a la relación entre la SLE y el tipo histológico del tumor primario, se pudo establecer una asociación clínica. La SLE en las pacientes con tumores del tipo histológico ductal fue del 83,6%, en las del tipo histológico lobulillar fue del 91,1%, y la SLE en las pacientes con tumores del tipo histológico medular fue del 83,3%. Se observa una reducción del riesgo de recidivar en aquellas pacientes con tumor primario del tipo histológico lobulillar ($HR=0,43$; $IC95\%=0,1-1,1$) ($p=0,097$) (Figura 64) (Tabla XXXI).

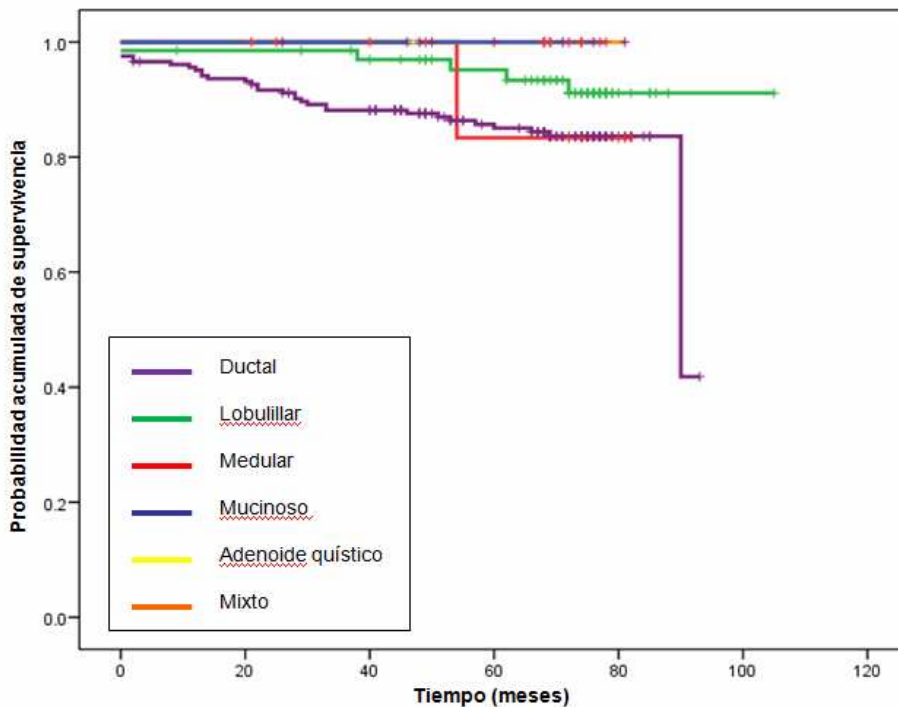


Figura 64. Curva de la supervivencia libre de enfermedad acumulada de las pacientes según el tipo histológico del tumor primario.

Tabla XXXI. Análisis univariable de la supervivencia libre de enfermedad en relación con los factores pronóstico clásicos.

Variable	Categorías	SLE (72m)	EE	HR*	IC 95%	p
Afectación ganglionar	Si	81,40%	0,061	1,506	0,7-3,3	0,325
	No	87,30%	0,022	1		
Tamaño tumor primario	0,1 - 2 cm	87,10%	0,023	1,547	0,7-3,4	0,296
	2,1 - 3 cm	79,00%	0,069	---		
Grado tumoral	I	88,50%	0,039	0,895	0,3-2,1	0,048
	II	89,40%	0,026	0,000		
	III	74,80%	0,059	2,393	1,0-5,7	
Tipo histológico	Ductal	83,60%	0,027	1		0,097
	Lobulillar	91,10%	0,038	0,432	0,1-1,1	
	Medular	83,30%	0,152	0,786	0,1-5,7	

IC95%: intervalo de confianza 95%. EE: error estándar. Significación estadística: $p < 0,05$. *Los HR están ajustados por todas las variables de la tabla.

VIII.D. Análisis univariable de la probabilidad acumulada de recidivar en las pacientes con cáncer de mama en estadios iniciales en relación con los factores pronóstico biológicos.

En el estudio de la relación de la SLE con la presencia de receptores de estrógenos, se encontró relación significativa. En el grupo de pacientes donde hubo presencia de RE, la SLE fue del 88,5%. En el grupo de pacientes que presentó ausencia de RE, la SLE fue del 78,8%. Se observa una reducción del riesgo de recidivar en aquellas pacientes con presencia de RE (HR=0,45; IC95%=0,2-0,9) ($p=0,040$) (Figura 65) (Tabla XXXII).

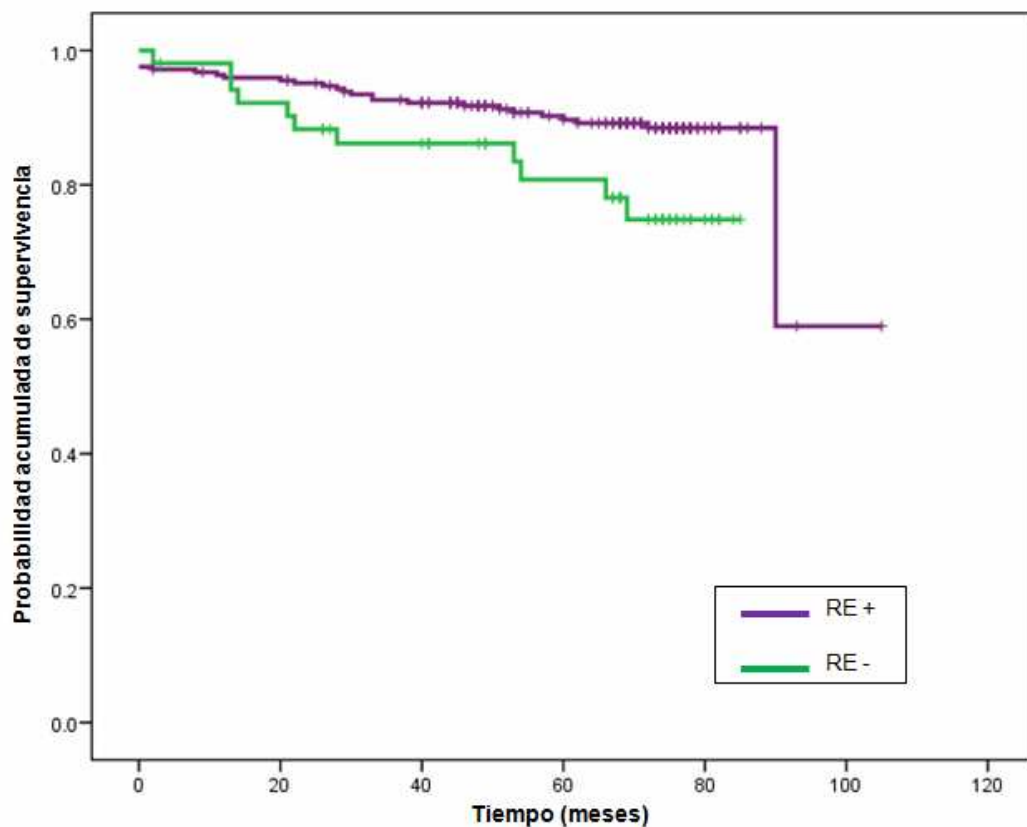


Figura 65. Curva de la supervivencia libre de enfermedad acumulada de las pacientes según la variable receptores de estrógenos.

Respecto a la relación entre SLE y la presencia de receptores de progesterona, no se encontró ninguna significación pronóstica (Tabla XXXII).

En el análisis de la relación entre la SLE y el índice de proliferación Ki67, se pudo establecer una asociación clínica. En el grupo de pacientes con un índice de proliferación menor o igual al 5% la SLE fue del 87,1%. En el grupo de pacientes con un Ki67 en el rango entre el 6% y el 50%, la SLE fue del 89,8%. En el grupo de pacientes en las que el índice de proliferación fue mayor o igual al 51%, la SLE disminuyó al 71,7%. Se observa que las pacientes con un $Ki67 \geq 51\%$ tienen un riesgo 2,0 veces mayor de recidivar que el resto de pacientes ($HR=2,07$; $IC95\%=0,9-4,6$) ($p=0,087$) (Figura 66) (Tabla XXXII).

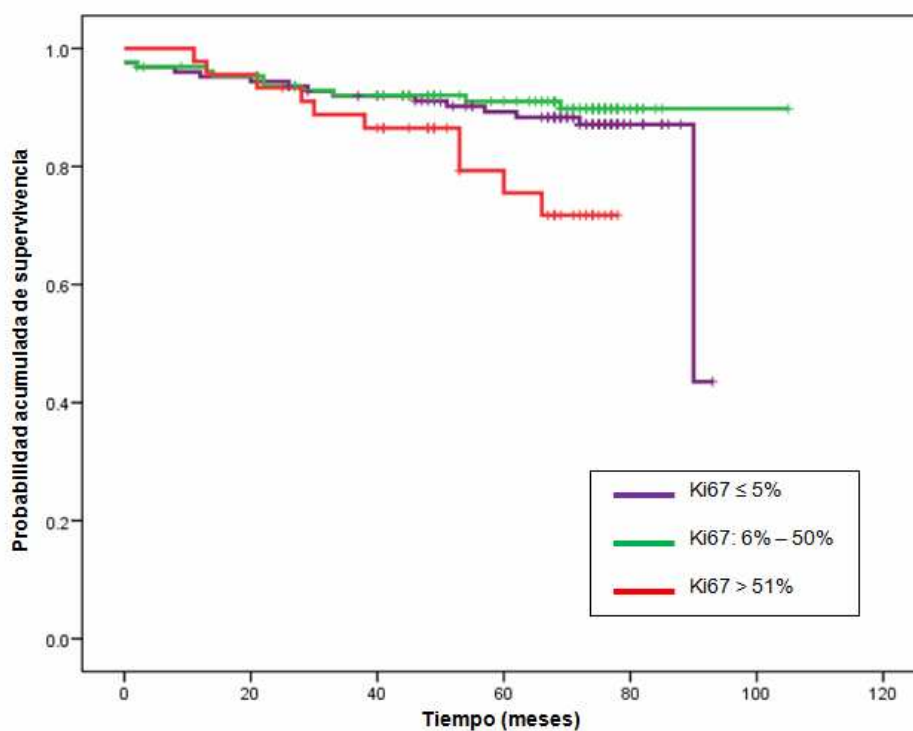


Figura 66. Curva de la supervivencia libre de enfermedad acumulada de las pacientes según el índice de proliferación Ki67.

No se encontró ninguna relación pronóstica entre la SLE y la expresión del gen HER2neu (Tabla XXXII).

Tabla XXXII. Análisis univariable de la supervivencia libre de enfermedad en relación con los factores pronóstico biológicos.

Variable	Categorías	SLE (72m)	EE	HR*	IC 95%	p
Receptores de estrógenos	Positivo	88,50%	0,022	0,457	0,2-0,9	0,040
	Negativo	74,80%	0,068	1		
Receptores de progesterona	Positivo	87,90%	0,022	0,784	0,3-1,5	0,507
	Negativo	81,10%	0,052	1		
Ki67	≤ 5%	87,10%	0,031	1		0,087
	6% - 50%	89,80%	0,028	0,785	0,3-1,6	
	≥ 51%	71,70%	0,080	2,078	0,9-4,6	
Her2neu	Positivo	88,20%	0,056	0,873	0,3-2,5	0,794
	Negativo	86,00%	0,023	1		

IC95%: intervalo de confianza 95%. EE: error estándar. Significación estadística: $p \leq 0,05$. *Los HR están ajustados por todas las variables de la tabla.

VIII.E. Análisis univariable de la probabilidad acumulada de recaer en las pacientes con cáncer de mama en estadios iniciales en relación con otros factores estudiados

El estudio de la relación entre la SLE y los resultados de la técnica de tinción con hematosilina-eosina, no determinó diferencias en la SLE de las pacientes. En pacientes con H&E positiva, la SLE fue del 83,2%, mientras que en las pacientes con resultado de H&E negativo, la SLE fue del 86,9% (Tabla XXXIII).

Respecto a la relación entre la SLE y los resultados de la técnica de tinción inmunohistoquímica, no se encontró significación pronóstica. Las pacientes con IHQ positiva presentaron una SLE del 90,9%. La SLE de las pacientes con IHQ negativa fue del 87,2% (Tabla XXXIII).

En el análisis de la relación entre la SLE y los antecedentes genésicos, no se encontró ninguna significación pronóstica. Ante la ausencia de antecedentes genésicos, la SLE fue del 89,9%, mientras que ante la presencia de cualquier tipo de antecedente genésico, la SLE fue del 85,5% (Tabla XXXIII).

No se pudo establecer ninguna relación entre la SLE y los antecedentes familiares de patología tumoral. Las SLE fueron de 87,3%; 91,6% y 84,9% para las pacientes con antecedentes familiares de cáncer de mama, pacientes con otros antecedentes familiares oncológicos y pacientes sin antecedentes familiares de enfermedad oncológica, respectivamente (Tabla XXXIII).

En el estudio de la relación entre la SLE y los antecedentes personales de patología benigna, sí se encontró asociación estadísticamente significativa. El riesgo de recidivar de las pacientes con antecedentes personales de patología benigna mamaria fue 5,8 veces mayor que en las pacientes con antecedentes personales de patologías benignas en otras localizaciones y que en las pacientes sin antecedentes personales de patología benigna (HR=5,85; IC95%=2,6-12,8) (Figura 67) (Tabla XXXIII).

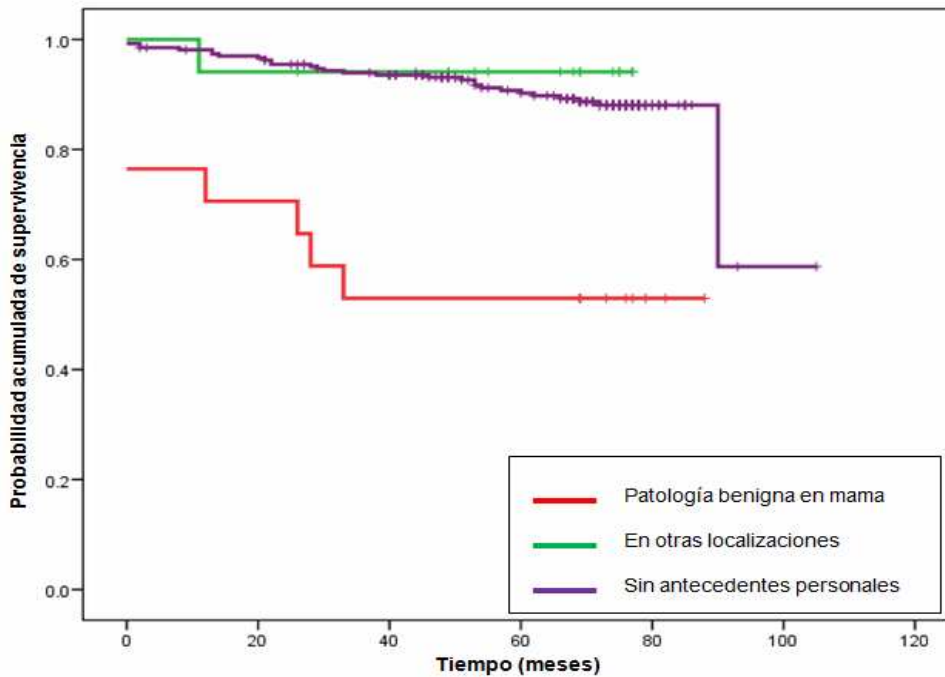


Figura 67. Curva de la supervivencia libre de enfermedad acumulada de las pacientes según sus antecedentes personales de enfermedad tumoral.

Respecto a la relación entre la SLE y el número de ganglios centinela encontrados en la cirugía, no se encontró asociación estadísticamente significativa ($p=0,533$) (Tabla XXXIII).

El análisis de la relación entre la SLE y el tamaño de las metástasis ganglionares no reveló diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo se observa un aumento en el riesgo de recidivar de 1,7 veces en las pacientes que presentaron células tumorales aisladas (CTA). Estas pacientes presentan una SLE de 66,7%, mientras que las SLE de las pacientes con tamaño de metástasis $\leq 2\text{mm}$ y $>2,1\text{mm}$ fueron de 82,4% y 88,9% respectivamente ($\text{HR}=1,72$; $\text{IC95\%}=0,2-14,3$) ($p=0,775$) (Tabla XXXIII).

No se pudo establecer ninguna asociación estadísticamente significativa entre la SLE y la realización o no de linfadenectomía. Las pacientes a las que se les realizó LFD

presentaron una SLE de 82,7%. La SLE de las pacientes a las que no se les realizó LFD fue del 87,2% ($p=0,332$) (Tabla XXXIII).

En el estudio del número de ganglios extraídos en la linfadenectomía no se determinó asociación estadísticamente significativa con la SLE. En las pacientes a las que no se les extrajo ningún ganglio, la SLE fue del 87,2%. En las pacientes a las que se les extrajeron de 4 a 9 ganglios, la SLE fue del 82,4%. En las mujeres a las que se les extrajeron de 10 a 15 ganglios, la SLE fue del 82,1%. (Tabla XXXIII).

En cuanto a la relación entre la SLE y el número de ganglios positivos extraídos en la linfadenectomía, no se determinó asociación estadísticamente significativa. Las mujeres con 0 ganglios positivos presentaron una SLE del 82,7%. Las pacientes que presentaron de 1 a 3 ganglios positivos mostraron una SLE del 62,2% ($p=0,227$) (Tabla XXXIII).

Respecto a la relación entre la SLE y el estadio del tumor primario, tampoco se determinó asociación estadísticamente significativa. Las mujeres con tumor primario en estadio I presentaron una SLE del 87,2%. La SLE de las mujeres con tumor primario en estadio IIA fue del 84,4% y la SLE de las pacientes con estadio de tumor primario IIB fue del 68,2% ($p=0,879$) (Tabla XXXIII).

Tabla XXXIII. Análisis univariable de la supervivencia libre de enfermedad en relación con otros factores estudiados.

Variable	Categorías	SLE (72m)	EE	HR*	IC 95%	p
H&E	Positiva	83,20%	0,06	1,297	0,5-2,9	0,547
	Negativa	86,90%	0,023	1		
IHQ	Positiva	90,90%	0,087	1		0,802
	Negativa	87,20%	0,023	1,214	0,3-5,3	
Antecedentes genésicos	GOP0	89,90%	0,039	1,7	0,3-1,7	0,404
	Otros	85,50%	0,024	1		
Antecedentes familiares	Mama	87,30%	0,04	0,901	0,4-1,9	0,88
	Otros	91,60%	0,04	1		
	No	84,90%	0,029	0,794	0,3-2,1	
Antecedentes personales	Mama	52,90%	0,121	5,854	2,6-12,8	0,001
	Otros	94,10%	0,057	1		
	No	88,10%	0,022	0,604	0,1-4,4	
N° de ganglios centinela	1	83,70%	0,038	1		0,533
	2	87,60%	0,032	0,7	0,3-1,4	
	≥3	88,20%	0,042	0,664	0,2-1,6	
Tamaño de las metástasis ganglionares	≤2	82,4	0,066	1		0,775
	>2,1	88,90%	0,074	0,702	0,1-3,4	
	CTA	66,7	0,272	1,72	0,2-14,3	
LFD	Si	82,70%	0,054	1,446	0,7-2,9%	0,332
	No	87,20%	0,023	1		
Ganglios extraídos en la LFD	0	87,20%	0,023			0,415
	4-9	82,40%	0,092			
	10-15	82,10%	0,068	1,115	0,8-1,4	
Ganglios + en LFD	0	82,70%	0,065	0,631	0,2-1,5	0,227
	1-3	62,20%	0,178	1		
Estadio	I	87,20%	0,024	1,213	0,5-2,5	0,879
	IIA	84,40%	0,048	1,642	0,3-6,9	
	IIB	68,20%	0,207	0,785	0,1-5,7	

IC95%: intervalo de confianza 95%. EE: error estándar. Significación estadística: $p \leq 0,05$. *Los HR están ajustados por todas las variables de la tabla.

VIII.F. Análisis multivariable de la supervivencia libre de enfermedad

Una vez establecidas las variables pronósticas que influyen en la SLE analizamos la importancia relativa de cada una de ellas, mediante un análisis multivariable. En este modelo de análisis se incluyeron el tipo tumoral, la presencia de RE, la expresión del índice de proliferación Ki67 y los antecedentes personales.

Las variables que presentaron valor pronóstico independiente en el riesgo de recidivar de las pacientes con cáncer de mama fueron la presencia de receptores de estrógenos ($p=0,039$) y los antecedentes personales ($p<0,001$).

La probabilidad de recidivar de las mujeres con presencia de RE es 0,4 veces inferior que en aquellas en las que hubo ausencia de RE (HR=0,47; IC95%=0,2-0,9) ($p=0.039$).

Los antecedentes personales también mostraron significado pronóstico independiente. Las mujeres que presentaban antecedentes personales de patología benigna mamaria mostraron una probabilidad 5,9 veces superior de recidivar que las pacientes con antecedentes de patología benigna en otras localizaciones o sin antecedentes de patología benigna (HR=5,93; IC95%=2,7-13,0) ($p<0,001$).

DISCUSIÓN

El cáncer de mama es tumor más frecuente en mujeres. Se estima que cada año se diagnostican 429.900 mujeres con cáncer de mama (*Ferlay J, et al. 2007*). En el EUROCARE-5 se muestra que las tasas de supervivencia correspondientes a esta neoplasia en Europa es del 81,9% (IC95%, 81,6-82,0). La media europea ha aumentado en los últimos años del 78,4% al 82,4% (*De Angelis R, et al. 2014*). En España la cifra asciende a unos 25.000 casos al año, lo que representa casi el 30% de todos los tumores del sexo femenino en nuestro país, constituyendo por tanto, un importante problema sanitario.

Se han producido importantes progresos en todos los aspectos de esta patología tumoral. Estos avances abarcan desde el estudio de los factores de riesgo, predictivos y pronósticos, hasta el desarrollo de una taxonomía molecular, mejoras en las técnicas de diagnóstico y quirúrgicas o avances en farmacogenética, etc., todos ellos fruto de un gran número de ensayos clínicos cuyo fin es mejorar el pronóstico y calidad de vida de las pacientes.

El GC se define como aquel ganglio que recibe directamente el drenaje linfático desde el tumor primario, y por lo tanto, es el primer ganglio que se verá involucrado cuando el tumor metastatice por la vía linfática. Actualmente, en tumores microinvasivos menores de 3cm y en estados precoces, se realiza la técnica de la biopsia del ganglio centinela. En el caso de que ésta sea 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 del la axila entre un 94% a un 98% (*Bland KI, et al. 2003*).

El proceso de diseminación y metástasis es dinámico, pasando por una serie de etapas: invasión de la matriz extracelular, diseminación vascular y alojamiento de las

células tumorales. Es necesario que la célula tumoral complete este proceso para originar una metástasis detectable. El resultado final depende de las propiedades intrínsecas de las células tumorales, que determinarán su capacidad para completar todos los pasos necesarios (*Demicheli R, et al. 1997*) y de la respuesta inmune del hospedador (*Hakim AA. 1988*).

Las micrometástasis, según la clasificación TNM, se definen como: "Focos de células tumorales menores de 1-2mm en una zona ganglionar". En el cáncer de mama, las primeras metástasis son linfáticas y estas pueden dar lugar a una nueva diseminación, vía hematogena o linfática, de las células tumorales (*Leong SP, Tseng WW. 2014*).

En nuestro estudio, siguiendo las definiciones de la séptima edición del *Cancer Staging Handbook* del *American Joint Committee of Cancer (AJCC)*, publicada en 2010 (*Edge SB, et al. 2010*), hubo un 19,5% (59 de 302) de pacientes en las que se detectó metástasis. De ellas el 64,4% presentaron macrometástasis, al 30,5% se le detectó micrometástasis y al 5,1% se le detectó CTAs. Esto se traduce, en toda la población, en un 12,6% (38 de 302) de macrometástasis, un 5,9% (18 de 302) micrometástasis y un 0,9% (3 de 302) de pacientes con CTAs. En general, en los trabajos publicados por otros autores que contemplan esta clasificación, obtienen unos valores en sus poblaciones del 0,4-62% de macrometástasis, un 0-38,1% de micrometástasis y un 0-30,2% de CTAs, acorde con nuestros resultados (*Krag DN, et al. 2010*) (*Gatzemeier W, Mann GB. 2013*) (*Donker M, et al. 2014*).

Actualmente, el estado de los nodos linfáticos axilares en el momento del diagnóstico sigue siendo uno de los indicadores pronóstico más importantes para las mujeres con cáncer de mama (*Carter CL, et al. 1989*). La presencia de metástasis en los

ganglios linfáticos, así como el número de ganglios implicados contribuyen de forma importante en la toma de decisiones con respecto al tratamiento sistémico adyuvante a aplicar. De hecho estos valores se asocian a un aumento en la probabilidad de recidiva y mortalidad (*Saez RA, et al. 1989*).

El objetivo de la disección de los ganglios linfáticos axilares es obtener información precisa sobre el estado de afección de la cadena linfática y el control local de la enfermedad. Sin embargo el procedimiento conlleva muchas complicaciones potenciales, como el linfedema, disfunción del hombro y parestesias (*Sahin AA, et al. 2009*).

En los últimos años la técnica de la BGC se considera de gran importancia ya que provee información sobre el estado de los ganglios axilares con una morbilidad menor que la disección completa de los ganglios. Por lo tanto, según los resultados de varios ensayos randomizados internacionales, la BGC se considera la técnica de elección ante los casos de pacientes con cáncer de mama temprano y nodos axilares clínicamente negativos (*Patani N, Mokbel K. 2009*) (*Veronesi U, et al. 2003*).

El ganglio linfático es una estructura tridimensional, por lo que, para su estudio es necesaria la realización de cortes seriados previo a la tinción con H&E, aumentando así la probabilidad de encontrar metástasis. Dado que las células epiteliales normales y las células tumorales contienen en su citoplasma moléculas propias del tejido epitelial, como son las citoqueratinas o el antígeno epitelial de membrana, la realización de la IHQ con anticuerpos para detectar estas moléculas permite su identificación específica.

El estado de afectación ganglionar durante una BGC se viene determinando mediante distintos métodos como el examen histopatológico y las técnicas inmunohistoquímicas. Según la Reunión de Consenso Nacional sobre la BSGC en el

Cáncer de Mama, celebrada en Murcia, en Noviembre del 2006 y organizada por la Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria, las técnicas más aconsejables para el análisis intraoperatorio del/los GC son mediante cortes por congelación, citología por raspado o impronta citológica. La IHQ intraoperatoria es una técnica óptima, pero no accesible o disponible en todos los centros.

Se define como ganglio positivo o afectado aquel que presenta células de características histopatológicas o inmunohistoquímicas de malignidad, diferenciando, como ya se ha mencionado, entre metástasis, micrometástasis, y células tumorales aisladas (*Piñero A, et al. 2007*). No obstante, ningún método ha sido estandarizado a nivel internacional para el análisis patológico del GC (*Liu LC, et al. 2011*), por lo que resulta complicado el análisis comparativo de los resultados de diferentes ensayos.

Ya que la afectación de los ganglios linfáticos es actualmente el factor pronóstico más importante en el cáncer de mama, es interesante y relevante poder utilizar técnicas moleculares en su detección, ya que aportan mayor sensibilidad y especificidad.

Actualmente, la identificación de genes que se sobre-expresan en el cáncer de mama, en combinación con los avances en las técnicas de Biología Molecular, dan lugar a la mejora en el estadiaje del cáncer de mama (*Gillanders WE, et al. 2004*). Existen artículos que demuestran que la técnica de RT-PCR es capaz de detectar enfermedad metastásica, a través de los ARNm que se producen en las células cancerosas, en los ganglios axilares de pacientes con cáncer de mama, con una sensibilidad de hasta una célula cancerosa entre 10^7 células normales, utilizando marcadores como la MG y la CK19, entre otros (*Noguchi S, et al. 1996*).

Los marcadores más estudiados para este fin son la CK19 y la MG. Se ha demostrado que la expresión de, por ejemplo la CK19, en ganglios axilares con cáncer de mama metastásico, puede alcanzar de 5 hasta 3.500 veces mayor expresión que la expresión detectable en un ganglio linfático normal (*Mitas M, et al. 2001*). CK19 y MG son los marcadores que empleamos en nuestro trabajo para la detección de micrometástasis.

La MG pertenece a un grupo de proteínas pequeñas de secreción incluidas en la superfamilia de las secretoglobinas (*Klug J, et al. 2000*). Estudios previos sugieren que la expresión de la MG estaría asociada con la proliferación de la glándula mamaria y la diferenciación terminal (*Watson MA, et al. 1998*). Watson y Fleming analizaron la expresión de MG en 35 carcinomas mamarios usando RT-PCR y Northern blot. Se comunicó la sobreexpresión de MG (al menos 10 veces respecto del tejido normal) en el 23% de los tumores estudiados (*Watson MA, et al. 1996*). Sin embargo, raramente se encuentra MG en tejido tumoral no mamario (*Houghton RL, et al. 2001*) (*O'Brien N, et al. 2002*), y además se ha determinado que la expresión de MG está restringida a la glándula mamaria adulta (*Watson MA, et al. 1996*) (*Fleming TP, et al. 2000*). Evidencias recientes demuestran que la MG es uno de los marcadores más sensibles y específicos descritos hasta el momento para la detección de micrometástasis en nodos linfáticos axilares y que la determinación de MG en cáncer de mama en estadios tempranos puede proporcionar información pronóstica independiente (*Marchetti A, et al. 2001*) (*Zehentner BK, et al. 2002*).

La CK19 es una proteína de 40 kDa perteneciente a la familia de las Queratinas. Teniendo en cuenta que la expresión de queratina varía de forma importante de unos epitelios a otros, esta expresión se viene utilizando ampliamente para determinar la

huella genética de varios carcinomas. La CK19 en concreto constituye el marcador más usado para la detección de células tumorales diseminadas mediante RT-PCR en ganglios linfáticos, sangre periférica y médula ósea de pacientes con cáncer de mama, tanto operable como metastásico (*Brown NM, et al. 2006*). Esto es debido a la heterogeneidad de las queratinas entre distintos epitelios y su capacidad de permanecer estables durante el proceso de malignización.

En este estudio se ha determinado la frecuencia y el valor pronóstico de la expresión de MG y CK19. Hemos analizado también el valor pronóstico de las relaciones que se establecen entre la expresión de estos marcadores y los factores pronóstico clásicos, biológicos y otras variables clínico-patológicas recogidas en la historia clínica de las pacientes. Todo esto en una cohorte prospectiva de 302 mujeres diagnosticadas de cáncer de mama en estadios I y II, sin afectación clínica axilar y candidatas a la técnica de la BGC. Se excluyeron del estudio las pacientes cuyas cirugías fueron profilácticas. Ninguna de las pacientes había recibido tratamiento neoadyuvante, ya que estudios a gran escala han demostrado que la administración de esta terapia puede afectar a la precisión de la BGC disminuyendo la tasa de detección y aumentando las tasas de falsos negativos (*Kuehn T, et al. 2013*) (*Boughey JC, et al. 2013*).

La tasa de detección de micrometástasis varía dependiendo de varios factores, siendo uno de los más importantes la técnica empleada. A pesar del buen pronóstico de las pacientes de cáncer de mama con nodos negativos, del 25 al 30% de ellas desarrollarán recurrencias locales o metástasis distales en un plazo de 10 años (*Fisher B, et al. 1983*). Algunos estudios sugieren que este desenlace desfavorable puede estar debido en parte a la presencia de metástasis ocultas no detectadas en los ganglios

linfáticos. Se desprende de esto la importancia de las técnicas utilizadas para el análisis de los GC biopsiados y/o nodos extraídos en las LFD.

La evaluación de los ganglios ha sufrido modificaciones a lo largo de los años. En la mayoría de los hospitales, el estudio anatomopatológico se realiza mediante cortes seriados a distintos niveles para su tinción con H&E y análisis IHQ, de forma intraoperatoria. Sin embargo en la rutina, el patólogo tiene solo un 1% de probabilidades de identificar un foco micrometastásico del diámetro de 3 células (*Gusterson BA, et al. 1990*). Esto implica que las micrometástasis constituidas por hasta 3 células tienen un 99% de probabilidades de no ser detectadas en el diagnóstico (*Neville AM. 1991*). En la tinción IHQ se emplean varios anticuerpos monoclonales y policlonales contra el antígeno epitelial y otros antígenos expresados en las células cancerosas. Los anticuerpos anti-CK son los más empleados debido a que su sensibilidad y especificidad son mayores en comparación con otros anticuerpos específicos anti-epitelio. Otros antígenos utilizados en la detección de micrometástasis en cáncer de mama son los receptores anti-factor de crecimiento epitelial humano (HER2neu) y el anticuerpo anti molécula de adhesión epitelial (anti-EpCAM). Mediante esta técnica se detectan micrometástasis en el 9 al 30% de los casos en los que el ganglio había sido clasificado como negativo mediante la H&E (*Treseler P. 2006*). En toda la población de nuestro estudio se encontraron 11 (3,6%) casos diagnosticados como negativos por H&E, que posteriormente resultaron positivos mediante IHQ. A pesar de estas mejoras en la detección de micrometástasis existen varias situaciones que pueden disminuir la sensibilidad de la técnica, como la pérdida de expresión de CK por parte de las células cancerosas, variaciones en la especificidad en relación a los

antígenos tumorales, una alta autofluorescencia del tejido y variaciones subjetivas en la interpretación de resultados.

En la última década se han desarrollado numerosos avances en el diagnóstico molecular de cáncer de mama centrando los esfuerzos en la utilización de la RT-PCR. Los marcadores que se emplean en esta técnica incluyen citoqueratinas, mamaglobina y el antígeno carcinoembrionario. Del 15 al 40% de los nodos linfáticos clasificados como negativos por histopatología y por IHQ, al analizarlos con RT-PCR se clasificaron como positivos (*Viale G, et al. 2008*) (*Visser M, et al. 2008*).

En nuestro trabajo encontramos 15 mujeres diagnosticadas como negativas para micrometástasis por H&E y por IHQ que, al analizarlas por RT-PCR se reclasificaron como positivas. De ellas, hubo 3 pacientes que presentaron recidiva, 2 en la misma mama y 1 en la mama contralateral. Esta última falleció a los 46 meses tras la cirugía. A estas pacientes no se les realizó LFD. De las 15 pacientes, solo una de ellas se encontraba en el grupo en el que se había realizado el diagnóstico además por RT-PCR a tiempo real, observándose también por esta técnica, un resultado positivo. A esta paciente tampoco se le realizó LFD, pero no presentó recidiva ni falleció hasta la fecha del fin del seguimiento clínico.

La RT-PCR a tiempo real y la RT-PCR convencional se han comparado en nuestro estudio mostrando una correlación exacta para la detección de MG (Kappa=1,000; $p<0,001$) y una correlación excelente en la detección de CK19 y en la detección de MG y/o CK19 (Kappa=0,943; $p<0,001$).

Sin embargo, la técnica de RT-PCR a tiempo real puede resolver algunas limitaciones que presenta la RT-PCR convencional, como que, al ser tan sensible, puede detectar niveles de marcador que son basales en tejido sano, considerando esos niveles

basales como falsos positivos. Con la RT-PCR a tiempo real, al ser cuantitativa, se puede diferenciar entre los niveles basales de un marcador determinado en tejido sano y los niveles de sobreexpresión de ese marcador en tejido tumoral (*Mitas M, et al. 2001*), además es más rápida, pudiendo obtener un resultado dentro del mismo acto quirúrgico.

Todas estas aproximaciones nos deben llevar hacia la estandarización de las técnicas y a la reproducibilidad de los resultados, a la vez que a minimizar el riesgo de falsos negativos y positivos.

A pesar de la importancia en los avances en el diagnóstico y los tratamientos, existe un 25% de pacientes con enfermedad localizada y ausencia de afectación axilar que presentará recidiva sistémica a pesar de un aparente tratamiento primario exitoso. En el caso de pacientes con afectación axilar inicial, el 30% de ellas no presentarán recidiva en los 5-10 años posteriores (*Fisher B, et al. 2002*). Estos datos sugieren la existencia de otros factores influyentes, diferentes al estado de afectación de los ganglios axilares, como el tamaño, el grado y el tipo del tumor primario, la expresión de receptores hormonales, del gen HER2neu, del índice de proliferación Ki67, de MG y de CK19, así como la presencia de antecedentes personales de patologías benignas, entre otros factores.

En nuestro estudio los resultados indican que el 16,5% de las pacientes de la población resultó ser positiva para la expresión de MG, el 12,6% resultó ser positiva para la expresión de CK19 y el porcentaje para la expresión de MG y/o CK19 fue del 18,5%. La presencia de cualquiera de estos dos marcadores o ambos a la vez indica la presencia de micrometástasis en el ganglio. En la literatura la tasa de identificación de micrometástasis varía entre el 2,3% y el 27% (*Weaver DL. 2010*). Este amplio rango puede deberse a las diferentes técnicas utilizadas para la detección de afectación en el

ganglio, ya que, como ya se ha mencionado, actualmente no existe un procedimiento estandarizado internacionalmente (*Liu LC, et al. 2011*).

En este trabajo se realizó el análisis de la sensibilidad, especificidad, el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo de la técnica de la RT-PCR en relación a los resultados obtenidos por tinción con H&E y por tinción IHQ. En cuanto a la sensibilidad de la RT-PCR frente a H&E, se alcanzó el 91,4% para la MG, el 93,3% para la CK19 y el 89,4% para MG y/o CK19. Los porcentajes obtenidos al analizar RT-PCR frente a la tinción IHQ fueron del 95,1% en el caso de la MG, del 96,3% para la CK19 y del 93,8% para MG y/o CK19. Lo que indica que hay un 89,4% de probabilidad de clasificar correctamente mediante RT-PCR a una paciente cuyo resultado real sea el definido como positivo mediante H&E, y un 93,8% mediante IHQ.

Con respecto a la especificidad, frente a H&E se alcanzó valores del 59,6% al considerar los resultados de la RT-PCR para MG, 44,7% al considerar los resultados de la RT-PCR para CK19 y 61,7% teniendo en cuenta los resultados de la RT-PCR para MG y/o CK19. Si el estado real es definido como negativo mediante IHQ, se alcanzan unos porcentajes de 81,8% para la MG, 72,4% para la CK19 y 100% al considerar los resultados de la RT-PCR para MG y/o CK19. Lo que indica que hay un 61,7% de probabilidad de clasificar correctamente a una paciente mediante RT-PCR cuyo estado real sea el definido como negativo mediante H&E, y de un 100% mediante a IHQ.

Comparando la relación entre los resultados obtenidos mediante la técnica de RT-PCR frente a los resultados obtenidos por H&E, la tasa de valor predictivo positivo, que se considera como los verdaderos positivos entre los resultados positivos de la RT-PCR, alcanza el valor del 92,7%. En la relación entre los resultados obtenidos mediante la técnica de RT-PCR frente a los resultados obtenidos por IHQ, el porcentaje asciende

al 100,0%. En cuanto al valor predictivo negativo, proporción de verdaderos negativos con respecto a los resultados negativos mediante RT-PCR, alcanzó el 51,8%. Cuando la relación analizada es entre los resultados obtenidos mediante la técnica de RT-PCR frente a los resultados obtenidos por IHQ, el porcentaje obtenido es del 42,3%.

Estos altos valores de sensibilidad se corresponden con los alcanzados por otros autores, como en el trabajo de Gillanders y cols., en el que consiguen una sensibilidad de la RT-PCR frente a H&E del 93% en una población de 344 pacientes de cáncer de mama en estadios tempranos, con ganglios clínicamente negativos (*Gillanders WE, et al. 2004*). En el estudio de Viale y cols. (*Viale G, et al. 2008*) en el que analizan una serie consecutiva de 293 GC de 293 pacientes de cáncer de mama, cuyo tumor primario era menor de 3cm, con ganglios clínicamente negativos y candidatas a la BGC, alcanzan una sensibilidad del 77,8%, una especificidad del 95,0%, un valor predictivo positivo del 83,6% y un valor predictivo negativo del 92,9%.

Diversos autores han observado relaciones estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos mediante la técnica de la RT-PCR con algunas características clínico patológicas como el tamaño tumoral, el grado histológico, el estado de afectación ganglionar, los receptores hormonales, o la sobreexpresión del gen HER2neu (*Houvenaeghel G, et al. 2014*) (*Rovera F, et al. 2013*) (*Gillanders WE, et al. 2004*) (*Ahmed SS, et al. 2013*) (*Co M, Kwong A. 2015*). Estas variables pertenecen al grupo de factores pronóstico clásicos y factores pronóstico biológicos.

Los factores pronóstico clásicos estudiados en este trabajo fueron la afectación ganglionar, el tamaño del tumor primario, el grado tumoral y el tipo histológico del tumor.

En cuanto a la afectación ganglionar. Las pacientes que no presentaron afectación en los ganglios (84,1%), tuvieron un resultado en la RT-PCR negativo para MG, negativo para CK19 y negativo para MG y CK19. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por Ahmed y cols. (*Ahmed SS, et al. 2013*), en un estudio retrospectivo que incluyó 1044 pacientes de carcinoma de mama invasivo y candidatas a la técnica de la BGC. En esta población, 710 (68%) mujeres no presentaron afectación ganglionar, mientras que 334 (32%) pacientes sí presentaron marcadores tumorales.

En el estudio de la relación de los resultados obtenidos mediante RT-PCR y el tamaño del tumor primario encontramos trabajos como el de Gillanders y cols. (*Gillanders WE, et al. 2004*), en el que se establecen dos categorías: tumores ≤ 1 cm y >1 cm, y se alcanza significación estadística entre los tumores >1 cm y el resultado positivo de la RT-PCR. Sin embargo en nuestra población, en la que todos los tumores presentaban un tamaño ≤ 3 cm, no se encontraron significaciones estadísticas. Esto puede ser debido a que en la RT-PCR de estos autores se estudian otros marcadores además de la MG y la CK19, como mamB, muc1, CEA, PSE y PIP.

En el análisis de la relación entre el grado tumoral y la expresión de los marcadores tumorales se encontró relación estadísticamente significativa entre los grados I y II y la ausencia de expresión de MG, así como con la ausencia de expresión de MG y/o CK19 en conjunto. También en el trabajo de Gillanders y cols. (*Gillanders WE, et al. 2004*), se establece una relación significativa, en este caso, entre la presencia de expresión de los marcadores y los grados tumorales II y III frente al I.

Los factores pronóstico biológicos estudiados en este trabajo fueron la expresión de receptores de estrógenos, la de receptores de progesterona, la sobreexpresión del gen

HER2neu y el índice de proliferación Ki67. Se encontró una relación estadísticamente significativa en la relación entre la expresión de los marcadores tumorales y la expresión de receptores de estrógenos en el tumor primario. La presencia de RE se asocia significativamente a la ausencia de CK19, así como con la ausencia de MG y CK19 juntos. Con la ausencia de MG se establece una tendencia clínica.

Del mismo modo se estableció una relación estadísticamente significativa entre la ausencia de expresión de MG y/o CK19 combinados, con los porcentajes de expresión del índice de proliferación Ki67: $\leq 5\%$ y entre 6%-50%. Estos mismos porcentajes constituyen una tendencia clínica con la ausencia de expresión de MG.

En el trabajo publicado por Rovera y cols. (Rovera F, et al. 2013) encuentran también relación significativa entre la ausencia de expresión de marcadores tumorales y la expresión de RE en una cohorte de 1976 mujeres con cáncer de mama invasivo no metastásico. También se establece relación estadísticamente significativa en el estudio de Ahmed y cols. (Ahmed SS, et al. 2013). Respecto al índice de proliferación Ki67, en el trabajo de Rovera y cols. (Rovera F, et al. 2013), al estudiar la relación entre expresión de los marcadores tumorales y el porcentaje de expresión del Ki67, no se encuentra significación estadística. Sin embargo, en un metaanálisis que incluyó 46 estudios y más de 12.000 pacientes se concluyó que niveles altos de Ki67 en cáncer de mama temprano, estaba asociado a un mayor riesgo de recidiva (Luporsi E, et al. 2012).

Con todo esto, se confirma/observa la existencia de relaciones estadísticamente significativas entre la expresión de los marcadores MG y CK19 con variables de riesgo para el cáncer de mama, como la afectación ganglionar, el tamaño y el grado del tumor primario, la ausencia de expresión de receptores de estrógenos y la del índice de proliferación Ki67.

Antes estos resultados, se pensó que podrían existir otras variables, no incluidas dentro de los factores pronóstico clásicos ni biológicos, que podrían revelarse también como factores pronóstico.

En nuestro estudio se analizaron las relaciones entre la expresión de MG y CK19 y variables como los resultados obtenidos por H&E, los obtenidos por IHQ, los antecedentes genésicos de las pacientes, la existencia de antecedentes personales de patologías benignas o familiares de enfermedades oncológicas, el número de GC encontrados, el tamaño de las metástasis ganglionares, que se realizara o no LFD, el número de ganglios extraídos en LFD, cuántos de estos ganglios fueron positivos y el estadio del tumor primario. No se han encontrado numerosas referencias en las que se haya estudiado el posible valor pronóstico de estas variables. Sin embargo en nuestra población hemos encontrado varias relaciones estadísticamente significativas, como la relación entre la expresión de MG y CK19 y los resultados obtenidos por H&E. La relación se ha establecido entre los resultados negativos por H&E y la ausencia de expresión de MG, la de CK19 y la ausencia de ambos marcadores. De forma similar se ha establecido una relación significativa entre la expresión de los marcadores tumorales y los resultados obtenidos por IHQ. En este caso, presentar una IHQ negativa se asoció con la ausencia de expresión de MG, la de CK19 y la ausencia de MG y CK19 juntos. En el estudio de Bostick y cols., se demostró una correlación significativa entre la presencia de marcadores positivos por RT-PCR en el GC y es estado de los RE en el tumor primario, así como con el grado tumoral (*Bostick PJ, et al. 1998b*). En el trabajo de Lockett y cols., se analizó una serie consecutiva de 61 pacientes de cáncer de mama mediante H&E, IHQ y un ensayo de RT-PCR con múltiples marcadores. Encontraron 37 pacientes con nodos negativos por H&E e IHQ, de los cuales 15 (40%) se

reclasificaron como positivos por RT-PCR. También encontraron mayor expresión de marcadores tumorales junto con una disminuida SLE a los 5 años ($p=0,02$) (*Lockett MA, et al. 1998*).

Por otro lado, en nuestro estudio fue posible establecer una tendencia clínica entre la ausencia de expresión de MG y la presencia de antecedentes genésicos distintos de G0P0. En el estudio de Lambe y cols., se observa que el riesgo de padecer cáncer de mama disminuye con el número de embarazos a término, de forma que las mujeres que han dado a luz 5 o más hijos presentan la mitad de riesgo que las mujeres que nunca tuvieron un embarazo a término (*Lambe M, et al. 1996*). En esta línea existen estudios que revelan que el riesgo de una mujer de presentar cáncer de mama está asociado con su exposición a las hormonas producidas por sus ovarios, de forma que el embarazo y la lactancia tienen un efecto directo en las células mamarias, lo que causa que se diferencien para poder producir leche. Algunos autores sugieren que dichas células diferenciadas son más resistentes a convertirse en células cancerosas que las células que no presentan diferenciación (*Russo J, et al. 2005*) (*Britt K, et al. 2007*).

En el análisis de la relación entre la expresión de MG y CK19 y el número de GC encontrados, se estableció una relación significativa entre la ausencia de expresión de CK19 y aquellas pacientes en las que se encontraron 2 GC. Se observó también una tendencia clínica entre estas pacientes y la ausencia de MG y CK19 en conjunto. Existen estudios que demuestran que la presencia y el número de nodos axilares involucrados son fuertes predictores de la supervivencia, como el de Guinee y cols., (*Guinee VF, et al. 1993*), en el que observan que las tasas de supervivencia disminuyen cuanto mayor es el número de ganglios involucrados. Para pacientes con nodos histológicamente negativos, las tasas de supervivencia a los 5 y los 10 años fueron del

90% y el 84% respectivamente. En los pacientes que presentaron de uno a tres ganglios involucrados, las tasas de supervivencia a los 5 y los 10 años fueron del 73% y el 44% respectivamente.

Respecto al tamaño de las metástasis ganglionares se estableció significación estadística entre el 100% las pacientes que presentaron CTAs y la presencia de expresión de MG, la presencia de expresión de CK19, y la presencia de expresión de MG y/o CK19. Hansen y cols., evaluaron el GC en 696 mujeres por H&E e IHQ. Con una media del tiempo de seguimiento de 38 meses, el tamaño de las metástasis en los GC se reveló como factor pronóstico significativo (*Hansen NM, et al. 2004*).

En el estudio de la relación entre la expresión de los marcadores y que se realizara o no LFD, se encontró relación significativa entre las pacientes que no fueron sometidas a LFD y la ausencia de expresión de MG, la ausencia de expresión de CK19 y la ausencia de MG y CK19 juntos.

Con respecto al número de ganglios extraídos en la LFD, el 100% de las pacientes a las que se les extrajo entre 16 y 20 ganglios, presentó expresión de MG, expresión de CK19 y expresión de uno o ambos marcadores.

En el análisis del estadio tumoral se estableció significación estadística entre las pacientes con estadio tumoral I y la ausencia de expresión de MG, la ausencia de expresión de CK19 y la ausencia de expresión de MG y CK19 juntos. Se observa un claro aumento de expresión de los marcadores a medida que aumenta el estadio tumoral.

En cánceres tempranos de mama operables, el conocimiento sobre el estadio del tumor supone una información pronóstica importante e indica la probabilidad de recurrencia o muerte por la enfermedad. A pesar de la falta de valor predictivo por sí mismo, el estadio del tumor primario se utiliza convencionalmente como guía de uso

para la terapia sistémica, ya que indica la extensión de los límites del tumor, la diseminación del tumor y la información pronóstica asociada, en forma de riesgo de recurrencia del tumor (*Benson JR, et al. 2013*).

El análisis de la supervivencia se ha realizado en las 302 pacientes incluidas en el estudio. El seguimiento de las pacientes se ha realizado en la Unidad de Patología de la Mama, con una mediana del tiempo de seguimiento de 72 meses. En otros estudios se han realizado seguimientos de entre 40 y 95,6 meses.

En el análisis de la técnica de RT-PCR, no se encontró significación pronóstica respecto a la SG a los 72 meses, ni para la MG, ni para la CK19, ni considerando MG y/o CK19. Tampoco se encontró significación pronóstica respecto a la SLE. Sin embargo, las HR se aproximan a 2 tanto para la SG como para la SLE, por lo que existe la posibilidad de encontrar significaciones estadísticas si se ampliara el tiempo de seguimiento. En el estudio de Weaver y cols. (*Weaver DL, et al. 2011*), con una media de tiempo de seguimiento de 95,6 meses, encontraron peor SG y peor SLE en pacientes con metástasis ocultas que para pacientes sin metástasis.

Por otro lado, entre los factores pronóstico analizados en nuestro estudio de la SG, se encontró una asociación clínica con respecto a la expresión de RE, mientras que la presencia del índice de proliferación celular Ki67 y los antecedentes personales de patologías benignas fueron las variables que presentaron valor pronóstico.

En cuanto a la expresión de RE, se observó que la SG de las pacientes con receptores de estrógenos positivos fue del 96,6%, mientras que en aquellas que no presentaban receptores de estrógenos la SG fue del 89,7% (HR=0,231). Se observa un 67,9% de reducción del riesgo de fallecer en pacientes con presencia de RE, frente a las pacientes con ausencia de ellos.

En la literatura se muestran datos contradictorios y la mayoría de los estudios no encuentran ninguna asociación entre el estado de los receptores y la supervivencia de las pacientes (*De Boer M, et al. 2009*) (*Chua B, et al. 2001*). En nuestro estudio ya hemos visto que la presencia de RE ejerce un efecto protector aumentando la SG y SLE con respecto a la ausencia de RE. Esto concuerda con la noción de que los tumores RE positivos tienen un comportamiento menos agresivo. También encontramos una correlación positiva entre supervivencia y RE positivos en un estudio prospectivo que evaluaba el efecto de metástasis ocultas (depósitos de 0,2mm o menos) en la supervivencia (*Weaver DL, et al. 2011*). En este estudio también se mostró un riesgo reducido de muerte (HR=0,74) en las pacientes con RE positivos debido a una mejor respuesta a la terapia endocrina.

Respecto al índice de proliferación Ki67 se encontró significación pronóstica, ya que a medida que aumenta el porcentaje de expresión de Ki67, se observa una disminución de la SG. Podemos afirmar que el índice de proliferación Ki67 es un factor de mal pronóstico con respecto de la SG. En el trabajo de Sotiriou y cols., se concluye que la tasa de proliferación, además de el grado histológico, los RE, los RP y el HER2neu, están asociados tanto con la prognosis como con la sensibilidad a los tratamientos (*Sotiriou C, Puztai L. 2009*). Una tasa de proliferación alta se asocia con peor prognosis, pero al mismo tiempo, también predice una mayor sensibilidad a quimioterapia, observándose tasas más altas de respuesta patológica completa a la quimioterapia neoadyuvante (*Györffy B, et al. 2015*).

Se encontró asociación estadísticamente significativa entre los antecedentes personales de patologías benignas de las pacientes y la SG. El riesgo de fallecer de las pacientes con antecedentes personales de patologías benignas mamarias fue 8,71 veces

mayor que en las pacientes con antecedentes personales de patologías benignas en otras localizaciones y que en las pacientes sin antecedentes personales de patologías benignas.

Existen diferentes autores que han incluido en sus estudios la presencia de antecedentes personales de patologías benignas. Sin embargo no han sido muchas las referencias encontradas que analicen esta variable como posible factor pronóstico independiente, en lugar de solo como factor de riesgo. En el estudio de McPherson y cols. (*McPherson K, et al. 2000*) encontraron que las mujeres con hiperplasia atípica epitelial severa tienen un riesgo de 4 a 5 veces mayor de desarrollar cáncer de mama que las mujeres que no presentan ninguna alteración proliferativa en las mamas, y que las mujeres con quistes palpables, fibroadenomas complejos, papilomas ductales, adenosis esclerótica, o hiperplasia epitelial moderada o florida, tienen un riesgo ligeramente mayor (de 1,5 a 3 veces) que las mujeres que no han sufrido estos cambios, aunque este aumento no presentó significación clínica. Por su lado, Cuzick y cols. (*Cuzick J, et al. 2015*) encontraron que la hiperplasia epitelial conlleva un riesgo 2 veces mayor de desarrollar cáncer de mama que en la población general, mientras que en el caso de la hiperplasia atípica, el riesgo aumenta de 4 a 5 veces. También encontraron un riesgo incrementado en pacientes que presentaron quistes.

El análisis multivariable mostró que las variables que presentaron significado pronóstico independiente en el riesgo de fallecer de las pacientes de cáncer de mama fueron la presencia de receptores de estrógenos y la presencia de antecedentes personales de patología benigna. El análisis multivariable posibilita la consecución de las predicciones más precisas en cuanto a pronóstico (*Györffy B, et al. 2015*).

Con respecto a los receptores de estrógenos, se observa una reducción del riesgo en la probabilidad de fallecer del 67%, en las pacientes que presentan estos receptores.

La probabilidad de fallecer de las pacientes con antecedentes personales de patologías benignas mamarias fue 4,1 veces superior a la de las pacientes con antecedentes de patologías benignas en otras localizaciones o sin antecedentes.

En el estudio de la SLE, los factores pronóstico que determinan el riesgo de recidivar en nuestra población son el grado tumoral, el tipo histológico del tumor primario, la presencia de RE, el porcentaje de expresión de Ki67 y los antecedentes personales de patologías benignas.

En el análisis de la variable grado tumoral en relación a la SLE, se encontró que el riesgo de recidivar de las pacientes con tumor primario de grado tumoral III fue 2,3 veces mayor que en las pacientes con tumores primarios de grado I y II. Un bajo grado histológico está asociado de forma independiente con un mejor pronóstico en pacientes tratados solo con cirugía. Además predice menor sensibilidad a quimioterapia. Un alto grado histológico se asocia a peor prognosis, pero al mismo tiempo predice mayor sensibilidad a quimioterapia, al igual que sucedía con el índice de proliferación Ki67 (*Györfy B, et al. 2015*).

Con respecto a la relación entre la SLE y el tipo histológico del tumor primario, se pudo establecer una asociación clínica, observándose una reducción del riesgo de recidivar en aquellas pacientes con tipo histológico del tumor primario del tipo lobulillar. Estudios recientes muestran una SLE a los 5 años del 85% en cáncer de tipo lobulillar frente al 83% del cáncer de tipo ductal, observándose una disminución en la diferencia entre las SLE de ambos tipos tumorales. Sin embargo, el pronóstico para el

cáncer de tipo lobulillar se muestra más favorable que para el tipo ductal (Arpino G, et al. 2004).

En el estudio de la relación de la SLE con la presencia de receptores de estrógenos, se encontró una reducción del riesgo de recidivar del 55% en aquellas pacientes con presencia de RE. Houvenaeghel y cols. (Houvenaeghel G, et al. 2014) realizan un análisis multivariable en el que encuentran que los RE negativos están asociados a una peor SLE. Györffy y cols, encuentran en su análisis que presentar RE está independientemente asociado con un mejor pronóstico en pacientes tratados únicamente con cirugía (Györffy B, et al. 2015).

En el análisis de la relación entre la SLE y el índice de proliferación Ki67, se pudo establecer una asociación clínica. Se observa que las pacientes con un Ki67>51% tienen un riesgo 2,0 veces mayor de recidivar que el resto de pacientes. En el trabajo de Inwald y cols., estudiaron el valor pronóstico del Ki67 en una población de 3.658 mujeres diagnosticadas de cáncer de mama invasivo entre 2005 y 2011. En el análisis multivariable encontraron que el Ki67 era un factor pronóstico independiente tanto para la SG como para la SLE. La SLE a los 5 años fue de 86,7% y la SG fue de 83.3% en pacientes con valores de Ki-67<15% frente a una SLE de 75,8% y una SG del 82,8% en pacientes con valores de Ki67>45% (Inwald EC, et al. 2013).

En el estudio de la relación entre la SLE y los antecedentes personales de patologías benignas, se observó que el riesgo de recidivar de las pacientes con antecedentes personales de patologías benignas mamarias fue 5,8 veces mayor que en las pacientes con antecedentes personales de patologías benignas en otras localizaciones, y que en las pacientes sin antecedentes personales de patologías benignas. En el trabajo de Shaaban y cols., se analizaron 674 muestras de biopsias

benignas, que incluían 120 casos que desarrollaron cáncer posteriormente y 382 controles. La mediana del tiempo de seguimiento fue de 66,95 meses. En este estudio encontraron que la hiperplasia lobulillar atípica constituía el más importante factor de riesgo en el cáncer de mama, con un desenlace más desfavorable en pacientes <50 años. El riesgo relativo fue de 4,55. La hiperplasia de tipo usual presentó una peor SLE para los pacientes >50 años. En el caso de la hiperplasia ductal atípica el riesgo relativo fue de 2,03; frente al de la hiperplasia usual, que fue del 1,53 (*Shaaban AM, et al. 2002*).

El análisis multivariable de la SLE mostró que las variables que presentaron significado pronóstico independiente del resto de los factores analizados fueron la presencia de receptores de estrógenos y los antecedentes personales de patología mamaria benigna. En el estudio de Azim y cols., resultaron ser factor independiente de mal pronóstico los tumores con RE negativos en el análisis multivariable. Los pacientes con RE negativos presentaron peor SLE en comparación con aquellos que tuvieron sobreexpresión de RE (*Azim H. A. Jr., et al. 2008*).

El estado de los nodos linfáticos axilares en el momento del diagnóstico es uno de los factores pronóstico más importantes para mujeres con cáncer de mama (*Carter CL, et al. 1989*). La presencia de metástasis linfáticas y el número de nodos linfáticos involucrados están asociados con un aumento en la probabilidad de recurrencia y mortalidad (*Saez RA, et al. 1989*). En nuestro estudio no encontramos que estos factores sean factor pronóstico de SG ni de SLE, pero sí pudimos establecer significaciones estadísticas en las relaciones entre la expresión de MG y CK19 y el número de GC encontrados, el tamaño de las metástasis ganglionares, si se realizó o no LFD, y el número de ganglios extraídos en caso de que se realizara.

En la última década han aparecido diversos kits e instrumentos para la detección de metástasis en GC en cáncer de mama mediante RT-PCR a tiempo real. Estos incluyen reactivos listos para su uso, controles positivos y negativos y protocolos detallados para maximizar la estandarización del ensayo y la reproducibilidad de los resultados intra e inter laboratorio. Además se realizan en un intervalo corto de tiempo (aproximadamente 50 minutos) por lo que son válidos para su uso de forma intraoperatoria.

Las pacientes de nuestra población que han sido diagnosticadas mediante RT-PCR a tiempo real además de con la RT-PCR convencional, lo han sido mediante el uso del primer ensayo de RT-PCR a tiempo real aprobado por la FDA (GeneSearch Breast Lymph Node Assay, de Veridex) para la detección de micrometástasis en GC (*Palazzo J. 2006*). Ya se ha comentado que la correlación de resultados entre ambas técnicas fue excelente, pero encontramos una paciente cuyo resultado fue positivo por RT-PCR convencional y negativo mediante RT-PCR a tiempo real. Esto tiene sentido si consideramos que la RT-PCR convencional ha detectado expresión de base en tejido linfático del marcador, dando lugar a un falso positivo. Esta paciente no presentó recidiva ni falleció hasta el fin del periodo del seguimiento clínico.

Otro ensayo, más aceptado y extendido que el de Veridex, es el OSNA (one-step nucleic acid amplification assay). Este es un nuevo método basado en la RT-LAMP (reverse transcription loop-mediated isothermal amplification), un tipo de retrotranscripción que consiste en la transcripción reversa del ARNm de la CK19, utilizada como un marcador para cáncer de mama debido a su expresión en las células tumorales y su baja expresión en células linfáticas (*Tsujimoto M, et al. 2007*). Existen diferentes estudios que han validado la técnica OSNA como de alta sensibilidad y

especificidad para detectar metástasis en los ganglios (*Snook KL, et al. 2011*) (*Khaddage A, et al. 2011*) (*Schem C, et al. 2009*), lo que permite un análisis cuantitativo no operador dependiente con una sensibilidad cercana al 95%, claramente superior a la de la IHQ, que presenta valores de sensibilidad de entre el 70 y el 90% (*Visser M, et al. 2008*). En nuestro trabajo se alcanzó un valor de sensibilidad de la IHQ del 93,8% para la detección de micrometástasis.

Con esta tecnología y con la precisa definición del tipo de afectación ganglionar introducida en la séptima edición del *Cancer Staging Handbook* del *American Joint Committee of Cancer*, publicada en 2010 (*Edge SB, et al. 2010*), estableciendo las diferencias entre CTAs, micro y macrometástasis, multitud de autores han centrado sus esfuerzos en estudiar el seguimiento de las pacientes, su SG y SLE en relación al tamaño de las metástasis encontradas. En nuestro trabajo ya se ha mencionado que se encontró una significación estadística entre las pacientes que presentaron CTAs y la expresión de los marcadores estudiados, sin embargo, no se encontró ninguna significación pronóstica entre el tamaño de las metástasis encontradas en nuestras pacientes y la SG. Tampoco en la SLE, aunque se observa un aumento en el riesgo de recidivar de 1,7 veces en las pacientes que presentaron CTAs. Estas pacientes presentan una SLE de 66,7%, mientras que la SLE de las pacientes con tamaño de metástasis $\leq 2\text{mm}$ y $>2,1\text{mm}$ fueron de 82,4% y 88,9% respectivamente.

Otros autores, como *Truong y cols. (Truong PT, et al. 2010)*, mostraron en 9637 pacientes, un descenso estadísticamente significativo de 10 años en la SG de las pacientes con micrometástasis (pN1mi) en comparación a aquellas con ganglios negativos (pN0) en la LFD. En el estudio publicado por *Kuijt y cols. (Kuijt GP, et al. 2005)*, en 5196 pacientes, la tasa de SG fue menor en pacientes con micrometástasis,

aunque la diferencia solo alcanzó significación estadística en un subgrupo de pacientes a las que no se les administró terapia sistémica adyuvante. En el análisis multivariable la enfermedad micrometastásica resultó ser un factor pronóstico para la mortalidad, con o sin terapia sistémica. En el trabajo de Hansen y cols. (*Hansen NM, et al. 2009*), en 790 pacientes, las tasas de SG y SLE a los 72 meses no fueron diferentes entre pacientes con CTAs o micrometástasis y pacientes con ganglios negativos, mientras que las pacientes con macrometástasis (pN1) tuvieron unas tasas de supervivencia significativamente más bajas. Los datos publicados por Anderson y cols. (*Andersson Y, et al. 2010*) en 2010 no mostraron diferencias en la SG entre pacientes con ganglios linfáticos negativos y pacientes con CTAs o micrometástasis. Sin embargo los autores encontraron una peor tasa de SG en pacientes con micrometástasis en un subgrupo de mujeres menores de 50 años de edad. En la población completa la tasa de SLE a los 5 años fue similar en pacientes con nodos negativos y CTAs, mientras que fue significativamente más baja en pacientes con micro y macrometástasis. El estudio alemán publicado por De Boer y cols. (*De Boer M, et al. 2009*), en 2009 (N=2707) mostró una reducción de la SLE a los 5 años en pacientes con CTAs o micrometástasis que no habían recibido terapia sistémica adyuvante.

Son patentes las discrepancias en cuanto al significado pronóstico de la invasión mínima del GC. Es importante realizar estudios con poblaciones que contengan el mayor número de pacientes posible, como en los metaanálisis, siempre y cuando el análisis del estado de afectación de los nodos linfáticos se haya realizado siguiendo protocolos similares, de forma que de la comparación de resultados entre estudios se extraigan conclusiones fiables. Además, los tiempos de seguimiento deben ser más largos para determinar el verdadero impacto que tiene la presencia de CTAs, micro y

macrometástasis sobre la supervivencia, sobre todo teniendo en cuenta que las poblaciones estudiadas se componen de mujeres con tumores primarios en estadios muy tempranos. El desarrollo de técnicas para la detección molecular de micrometástasis en el cáncer de mama probablemente se traducirá en una mejor capacidad de planificar terapias adyuvantes a medida, pudiendo identificar pacientes con mayor riesgo y que podrían beneficiarse de terapias sistémicas más agresivas.

En esta línea encontramos los test pronóstico multigénicos, como el MammaPrint Score, el Oncotype DX Assay o el Genomic Grade Index, entre otros.

El MammaPrint (Agilent, Amsterdam, the Netherlands) es un marcador de pronóstico basado en micro-arrays y realizado por un laboratorio central, que fue aprobado por la FDA y en la Unión Europea como un ensayo pronóstico auxiliar en pacientes de cáncer de mama menores de 61 años, en estadios I o II, con nodos linfáticos negativos, o con de 1 a 3 nodos linfáticos positivos (*Mook S, et al. 2009*). Este ensayo mide la expresión del ARNm de 70 genes y estratifica los pacientes en grupos pronóstico de bajo riesgo o de alto riesgo (*van de Vijver MJ, et al. 2002*).

El Oncotype DX Assay (Genomic Health, Redwood City, CA, USA) es el ensayo más utilizado en los Estados Unidos en pacientes con cánceres RE positivos. Este ensayo utiliza mediciones de expresión de 16 genes relacionados con el cáncer y 5 "housekeeping genes" para calcular un índice de recurrencia de 0 a 100, que puede categorizarse en grupos de bajo riesgo (índice <18), riesgo intermedio (índice entre 18 y 30), o alto riesgo (índice ≥ 31) (*Paik S, et al. 2004*).

El Genomic Grade Index (MapQuant Dx, Ipsogen, France) es un ensayo basado en microarrays que mide la expresión de 97 genes para asignar un grado molecular. El ensayo fue desarrollado por comparación de perfiles de expresión génica de tumores de

grado I y grado III. Este test puede reclasificar cánceres RE positivos, histológicamente de grado intermedio, en grado molecular alto o bajo, con un pronóstico significativamente diferente.

Sin embargo estas técnicas presentan limitaciones. Estudios comparativos indican que frecuentemente se producen discordancias en la predicción de riesgo, cuando diferentes ensayos se aplican al mismo caso (*Prat A, et al. 2012*). Además no se han encontrado marcadores moleculares asociados con el tamaño del tumor ni con el estado de afectación ganglionar, que son dos de las variables clínico-patológicas más importantes en cuanto a pronóstico, lo que implica que en estos tests no se contempla esta importante información. Por estos motivos, el riesgo final de recidiva se determina teniendo en cuenta tanto las características moleculares como las anatómicas, ya que el tamaño tumoral y el estado de los nodos linfáticos son variables con valor pronóstico independiente (*Birkbak NJ, et al. 2012*). Por otro lado, se está incrementando el uso de los test pronóstico genómicos como herramientas en la selección de pacientes para ensayos clínicos, así como para definir poblaciones clínicamente relevantes para el desarrollo de medicamentos.

Estas y otras tecnologías, como la secuenciación de ARN, elaboración de perfiles de ARN, análisis de ADN libre circulante, e incluso el análisis del ADN de las propias células tumorales circulantes (lo cual ya realizamos en nuestro laboratorio), permiten profundizar más ampliamente en el desarrollo de modelos multivariados que, en el futuro nos llevará a construir modelos predictivos más robustos y fiables. Esto siempre con el fin de que los pacientes se beneficien al máximo de los tratamientos pautados específicamente para ellos.

CONCLUSIONES

1. El análisis de MG y CK19 por RT-PCR convencional y por RT-PCR a tiempo real muestra una fiabilidad entre métodos excelente, a través del índice kappa, pudiendo equiparar los resultados obtenidos por ambas tecnologías.
2. En pacientes con cáncer de mama en estadios tempranos la presencia de expresión de MG y CK19 es mayor en tumores primarios de grado III, frente a pacientes con tumores primarios de grado I y II.
3. En los ganglios cuyo tumor primario presenta un índice de proliferación celular Ki67 $\geq 51\%$, la expresión de MG y CK19 es mayor que la alcanzada con porcentajes de Ki67 menores al 50%.
4. Existe un 93,8% de probabilidad de no encontrar expresión de MG y CK19 en los ganglios diagnosticados como negativos por medio de tinción inmunohistoquímica.
5. Las pacientes en las que se detectaron 2 ganglios centinela, presentaron un 91,5% de ausencia de expresión de CK19, frente a un 8,5% de presencia de expresión de este marcador.
6. La expresión de MG y CK19 se asocia con mayores tamaños de las metástasis ganglionares.

7. En los ganglios en los que se detectan células tumorales aisladas existe siempre expresión de MG y CK19.
8. En las pacientes en las que no se realizó linfadenectomía se detectó un 91,8% de ausencia de expresión de MG y CK19, frente al 8,2% que sí expresaron estos marcadores tumorales.
9. La expresión de MG y CK19 se asocia con un mayor número de ganglios a extraer en la linfadenectomía.
10. Resultaron ser factor pronóstico independiente con respecto a la SG, los antecedentes personales de patologías benignas y la presencia de receptores de estrógenos.
11. El índice de proliferación celular Ki67 en porcentajes mayores o iguales al 51% es un factor de mal pronóstico con respecto a la SG y a la SLE.
12. Se observa un 67,9% de reducción del riesgo de fallecer en las pacientes con presencia de receptores de estrógenos, frente a las pacientes con ausencia de ellos.
13. Se observa un 55% de reducción del riesgo de recidivar en las pacientes con presencia de receptores de estrógenos, frente a las pacientes con ausencia de ellos.

14. Los antecedentes personales de patologías benignas constituyen una variable con valor pronóstico independiente en el riesgo de recidivar de las pacientes.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Acea Nebril B.; Sogo Manzano C.; Gómez Freijoso C. Linfadenectomía axilar en los carcinomas no infiltrantes de mama. *Cir Esp* 1999;65(5):421-427.
2. Ahmed SS, Thike AA, Iqbal J, Yong WS, Tan B, Madhukumar P, Ong KW, Ho GH, Wong CY, Tan PH. Sentinel lymph nodes with isolated tumour cells and micrometastases in breast cancer: clinical relevance and prognostic significance. *J Clin Pathol*. 2014 Mar;67(3):243-50. doi: 10.1136/jclinpath-2013-201771. Epub 2013 Nov 11.
3. Albertini JJ, Lyman GH, Cox C, Yeatman T, Balducci L, Ku N, et al. Lymphatic mapping and sentinel node biopsy in the patient with breast cancer. *JAMA* 1996;276:1818-1822.
4. Alonso-Bartolome P, Ortega Garcia E, Garijo Ayensa F, de Juan Ferre A, Vega Bolivar A. Utility of the tumor bed marker in patients with breast cancer receiving induction chemotherapy. *Acta Radiol*. 2002; 43:29-33.
5. American College of radiology (ACR). Practice guideline for the performance of diagnostic mammography. ACR 2002 and 2004.
6. American college of Radiology (ACR). Breast imaging reporting and data system. 4th ed. Reston (VA): ACR, 2003.

7. Andersson Y, Frisell J, Sylvan M, de Boniface J, Bergkvist L. Breast cancer survival in relation to the metastatic tumor burden in axillary lymph nodes. *J Clin Oncol* 2010;28(17):2868-73.
8. Aranceta J. Spanish food patterns. *Public Health Nutr* 2001; 4(6A): 1399-402.
9. Armes JE, Trute L, White D, Southey MC, Hammet F, Tesoriero A, Hutchins AM, Dite GS, McCredie MR, Giles GG, Hopper JL, Venter DJ. Distinct molecular pathogeneses of early-onset breast cancers in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: a population-based study. *Cancer Res.* 1999 Apr 15;59(8):2011-7.
10. Arpino G, Bardou VJ, Clark GM, Elledge RM. Infiltrating lobular carcinoma of the breast: tumor characteristics and clinical outcome. *Breast Cancer Res.* 2004, 6:R149-R156.
11. Asociación Española Contra el Cáncer (AECC). Junio 2011.
12. Azim H. A. Jr., Malek R. A., Elattar I., Elkheshen D., Azim H. The relation between hormone receptor status and disease-free survival in adjuvant breast cancer: A multivariate analysis. *Journal of Clinical Oncology, 2008 ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition).* Vol 26, No 15S (May 20 Supplement), 2008: 11527

13. Backus J, Laughlin T, Wang Y, Belly R, White R, Baden J, Justus Min C, Mannie A, Tafra L, Atkins D, Verbanac KM. Identification and characterization of optimal gene expression markers for detection of breast cancer metastasis. *J Mol Diagn.* 2005 Aug;7(3):327-36.
14. Bader BL, Jahn L, Franke WW. Low level expression of cytokeratins 8, 18 and 19 in vascular smooth muscle cells of human umbilical cord and in cultured cells derived therefrom, with an analysis of the chromosomal locus containing the cytokeratin 19 gene. *Eur. J. Cell Biol.* 1988; 47; 300–319.
15. Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, et al. Final version of the American Joint Committee on Cancer Staging System for Cutaneous Melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, Vol 19, n° 16 August 2001: 3635-3648.
16. Balch CM, Soong SJ, Geshenwald JE, et al. Prognostic factors analysis of 17600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer Melanoma Staging System. *Journal of Clinical Oncology*, Vol 19, n° 16 August 2001: 3622-3634.
17. Baum M, Demicheli R, Hrushesky W, Retsky M. Does surgery unfavourably perturb the “natural history” of early breast cancer by accelerating the appearance of distal metastases? *Eur J Cancer* 2005;41(4):508-15.

18. Beechey-Newman N. Sentinel node biopsy in primary breast cancer. *Int J Clin Pract.* 2002 Mar;56(2):111-5. Review. PMID: 11926697.
19. Benson JR, Gui G, Tuttle TM. *Early Breast Cancer (Third edition). Histological Risk Factors, Prognostic Indicators, and Staging.* CRC Press. 2013. P:236-49.
20. Berg JW. The significance of axillary node levels in the study of breast carcinoma. *Cancer.* 1955 Jul-Aug;8(4):776-8.
21. Berg WA, Blume JD, Cormack JB, Mendelson EB. Operator dependence of physician-performed whole-breast US: lesion detection and characterization. *Radiology.* 2006 Nov;241(2):355-65
22. Bernet, L., et al. Actualización del consenso sobre la biopsia selectiva del ganglio centinela en el cáncer de mama. *Revista de Senología y Patología Mamaria.* 2010; 23 (5), PP. 201-208.
23. Bilimoria M, Morrow M. The woman at increased risk for breast cancer: evaluation and management strategies. *Cancer J Clin* 1995;45:263-78.
24. Birkbak NJ, Wang ZC, Kim JY, Eklund AC, Li Q, Tian R, et al. Telomeric allelic imbalance indicates defective DNA repair and sensitivity to DNA-damaging agents. *Cancer Discov.* 2012;2:366–75.

25. Black DM. The genetics of breast cancer. *Eur J Cancer* 1994;30a:1957-61.
26. Bland KI, et al. Failure of routine axillary nodal sampling to predict survival outcomes in lymph node-negative (N0) breast cancer. *Ann Surg.* 2003 February; 237(2): 168-170.
27. Bloom HJG. Further studies on prognosis of breast carcinoma. *Br. J. Cancer* 1950; 4; 259-288.
28. Bloom HJG, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer. *Br. J. Cancer* 1957; 11; 359-377.
29. Borgstein PJ, Meijer S, Pijpers RJ, et al. Functional lymphatic anatomy for sentinel node biopsy in breast cancer. *Annals of Surgery* 2000; 232:81-89.
30. Bostick PJ, Chatterjee S, Chi DD, Huynh KT, Giuliano AE, Cote R, Hoon DSB. Limitations of specific reverse-transcriptase polymerase chain reaction markers in the detection of metastases in the lymph nodes and blood of breast cancer patients. *J Clin Oncol* 1998;16(8):2632-2640.
31. Bostick PJ, Huynh KT, Sarantou T, Turner RR, Qi K, Giuliano AE, Hoon DS. Detection of metastases in sentinel lymph nodes of breast cancer patients by multiple-marker RT-PCR. *Int J Cancer.* 1998 Dec 18;79(6):645-51.

32. Botha JL, Bray F, Sankila R, Parkin DM. Breast cancer incidence and mortality trends in 16 european countries. *Eur J Cancer* 2003; 39(12):1718-29.
33. Boughey JC, Suman VJ, Mittendorf EA, Ahrendt GM, Wilke LG, Taback B, et al. Alliance for Clinical Trials in Oncology: sentinel lymph node surgery after neoadjuvant chemotherapy in patients with node-positive breast cancer: the ACOSOG Z1071 (Alliance) clinical trial. *JAMA* 2013;310:1455-61.
34. Boyero M, González-Orus Marcos JM, Gómez Alonso A. Linfadenectomía axilar y biopsia del ganglio centinela en el tratamiento del cáncer de mama. *Cir Esp* 1999;66:333-338.
35. Brown NM, Stenzel TT, Friedman PN, Henslee J, Huper G, Marks JR. Evaluation of expression based markers for the detection of breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 2006;97:41–47. doi: 10.1007/s10549-005-9085-8.
36. Brouillet JP, Theillet C, Maudelonde T, Defrenne A, Simony-Lafontaine J, Sertour J, Pujol H, Jeanteur P & Rochefort H. Cathepsin D assay in primary breast cancer and lymph nodes: relationship with c-myc, c-erb-B-2 and int-2 oncogene amplification and node invasiveness. *European Journal of Cancer* 1990;26 437–441.

37. Brinton LA, Devesa SS. Etiology and pathogenesis of breast cancer: incidence, demographics and environmental factors. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Hellman S, eds. Diseases of the breast. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996:159-68.
38. Britt K, Ashworth A, Smalley M. Pregnancy and the risk of breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* 2007; 14(4):907–933
39. Buchbinder SS, Gurell DS, Tarlow MM, Salvatore M, Suhrland MJ, Kader K. Role of USguided fine-needle aspiration with on-site cytopathologic evaluation in management of nonpalpable breast lesions. *Acad Radiol* 2001 Apr; 8(4):322-327.
40. Cabanas RM. An approach for the treatment of penile carcinoma. *Cancer*.1997 Feb;39(2):456-66.
41. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24.740 breast cancer cases. *Cancer* 1989;63(1):181-187.
42. Carter D, Douglass JF, Cornellison CD, Retter MW, Johnson JC, Bennington AA, Fleming TP, Reed SG, Houghton RL, Diamond DL, Vedvick TS. Purification and characterization of the mammaglobin/ lipophilin B complex, a promising diagnostic marker for breast cancer. *Biochemistry* 2002;41:6714 –22.

43. Castelló A, Martín M, Ruiz A, Casas AM, Baena-Cañada JM, Lope V, Antolín S, Sánchez P, Ramos M, Antón A, Muñoz M, Bermejo B, De Juan- Ferré A, Jara C, Chacón JI, Jimeno MA, Rosado P, Díaz E, Guillem V, Lluch A, Carrasco E, Pérez-Gómez B, Vioque J, Pollán M and EpiGEICAM researchers. PLoS One. 2015; 10(5): e0126096. doi: 10.1371/journal.pone.0126096.
44. Centro Integral de Anatomía Patológica. Gral Paz 523 (Este) CP 5400, San Juan - Argentina. <http://www.ciap-lab.com.ar/servicios.php>.
45. Chang J, Clark GM, Allred DC, Mohsin S, Chamness G, Elledge RM. Survival of patients with metastatic breast carcinoma: importance of prognostic markers of the primary tumor. *Cancer*. 2003 Feb 1;97(3):545-53).
46. Cheung CC, Ezzat S, Freeman JL, Rosen IB, Asa SL. Immunohistochemical diagnosis of papillary thyroid carcinoma. *Mod. Pathol*. 2001; 14; 338-442.
47. Chlebowski RT, Blackburn GL, Thomson CA, Nixon DW, Shapiro A, Hoy MK, et al. Dietary fat reduction and breast cancer outcome: interim efficacy results from the Women's Intervention Nutrition Study (WINS). *J Natl Cancer Inst* 2006; 98:1767-76).
48. Chua B, Ung O, Tailor R, et al. Frequency and predictors of axillary lymph node metastases in invasive breast cancer. *ANZ J Surg* 2001;71:723-8.

-
49. Clare SE, Nakhlis F, Panetta JC. Molecular biology of breast cancer metastases. The use of mathematical models to determine relapse and to predict response to chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2000;2(6):430-5.
 50. Co M, Kwong A. Macrometastasis, micrometastasis, and isolated tumor cells in sentinel lymph nodes of early breast cancers: a 10-year histopathological and survival analysis of 537 Asian patients. *World J Surg*. 2015 Jun;39(6):1438-42. doi: 10.1007/s00268-015-2984-x.
 51. Cody HS 3rd, Urban JA. Internal mammary node status: a major prognosticator in axillary node-negative breast cancer. *Ann Surg Oncol*. 1995 Jan;2(1):32-7. PMID: 7834452.
 52. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53.297 women with breast cancer and 100.239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. *Lancet* 1996;347:1713-27.
 53. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52.705 women with breast cancer and 108.411 without breast cancer. *Lancet* 1997;350:1047-59.

54. Colomer R, Viñas G, Beltran M, Izquierdo A, Lluch A, Llombart-Cussac A, Alba E, Munárriz B, Martín M; Spanish Breast Cancer Research Group. Validation of the 2001 St Gallen risk categories for node-negative breast cancer using a database from the Spanish Breast Cancer Research Group (GEICAM). *J Clin Oncol*. 2004 Mar 1;22(5):961-2
55. Colpitts TL, Billing-Medel P, Friedman P, Granados EN, Hayden M, Hodges S, et al. Mammaglobin is found in breast tissue as a complex with BU101. *Biochemistry*. 2001;40:11048-59.
56. Comisión Europea. Guía para la correcta solicitud de pruebas de diagnóstico por imagen (Protección radiológica 118). Luxemburgo: Oficina de publicaciones oficiales de las comunidades Europeas. 2000.
57. Corradini P, Voena C, Astolfi M, Dell'Oro S, Pilotti S, Arrigoni G, et al. Maspin and mammaglobin genes are specific markers for RT-PCR detection of minimal residual disease in patients with breast cancer. *Ann Oncol*. 2001;12:1693-8.
58. Costa SD, Lange S, Klinga K, Merkle E, Kaufmann M. Factors influencing the prognostic role of oestrogen and progesterone receptor levels in breast cancer--results of the analysis of 670 patients with 11 years of follow-up. *Eur J Cancer*. 2002 Jul;38(10):1329-34

-
59. Cox CE, Dupont E, Whitehead GF, Ebert MD, Nguyen K, Peltz ES, Peckham D, Cantor A, Reintgen DS. Age and body mass index may increase the chance of failure in sentinel lymph node biopsy for women with breast cancer. *Breast J.* 2002 Mar-Apr;8(2):88-91).
60. Cox C.E., Pendas S., Cox J.M., Joseph E., Shons A.R., Yeatman T., Ni Ni Ku, Lyman G.H., Berman C., Hadad F., and Reintgen D.S. Guidelines for sentinel node biopsy and lymphatic mapping of patients with breast cancer. *Ann. Surg.* 1.998, 227 (5), 645-651 y 651-653
61. Cserni G. Metastases in axillary sentinel lymph nodes in breast cancer as detected by intensive histopathological workup. *J Clin Pathol* 1999;52:922-924.
62. Cuzick J, Sestak I, Thorat MA. Impact of preventive therapy on the risk of breast cancer among women with benign breast disease. *Breast.* 2015 Aug 6. pii: S0960-9776(15)00151-4. doi: 10.1016/j.breast.2015.07.013. [Epub ahead of print]
63. De Angelis R, Sant M, Coleman MP, Francisci S, Baili P, Pierannunzio D, et al. Cancer survival in Europe 1999-2007 by country and age: results of EURO CARE-5-a population-based study. *Lancet Oncol.* 2014 Jan;15(1):23-34.
64. de Boer M, van Deurzan CH, van Dijck JA, et al. Micrometastasis or isolated tumor cell and the outcome of breast cancer. *N Engl J Med* 2009;361:653-63.

65. Delaloye JF, Monod JF, Friedli A, Burgener F, Stalder JB, Fiche M, De Grandi P, Delaloye AB. [Network for sentinel lymph node research in breast cancer]. *Rev Med Suisse Romande*. 2003 May;123(5):299-302.
66. DeMichele A, Webber BL. Inherited genetic factors. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK, eds. *Diseases of the Breast*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000:221-36.
67. Demicheli R. Growth of testicular neoplasm lung metastases: tumor-specific relation between two Gompertzian parameters. *Eur J Cancer*. 1980 Dec;16(12):1603-8.)
68. Demicheli R, Retsky MW, Swartzendruber DE, Bonadonna G. Proposal for a new model of breast cancer metastatic development. *Ann Oncol*. 1997 Nov;8(11):1075-80.
69. De Moulin D. *A short history of breast cancer*. Martinus Nijhoff Publishers, Boston 1983.
70. Die Goyanes A. Cirugía moderna del cáncer de mama. *Revisiones en cáncer*. 1987;1:45-52.
71. Die Goyanes. Breve relato de la evolución histórica del tratamiento quirúrgico del cáncer de mama. *Cirugía Española*. Vol.54, Julio 1993, Núm.1. Pag.61-68.

-
72. Doncella S, Ferro P, Bacigalupo B, Dessanti P, Giannico A, Gorji N, et al. Relationship between human mammaglobin m RNA expresión in breast cancer tissue and clinico-pathologic features of the tumors. *J Exp Clin Cancer Res* 2006;25(1):65-72.
73. Donegan WL. Tumor-related prognostic factor for breast cancer. *CA Cancer J Clin* 1997;47:2-51.
74. Donker M, van Tienhoven G, Straver ME, Meijnen P, van de Velde CJ, Mansen RE, et al. Radiotherapy or surgery of the axilla after a positive sentinel node in breast cancer (EORTC 10981-22023 AMAROS): a randomised, multicentre, open label, phase 3 non-inferiority trial. *Lancet Oncol*. 2014;15:1303-10.
75. Duffy MJ, McGowan PM, Harbeck N, Thomssen C, Schmitt M. uPA and PAI-1 as biomarkers in breast cancer: validated for clinical use in level-of-evidence-1 studies. *Breast Cancer Res*. 2014 Aug 22;16(4):428. doi: 10.1186/s13058-014-0428-4.
76. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet*. 1998 May 16;351(9114):1451-67.

77. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effect of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005;365(9472):1687-717.
78. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al. Chapter 32 (Breast) In: The 7th edition of the Cancer Staging Handbook from the American Joint Committee on cancer. NY. USA: Springer, 2010.
79. Elston C, Ellis I. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991; 19: 403-10.
80. Engel J, Eckel R, Kerr J, Schmidt M, Fürstenberger G, Richter R, Sauer H, Senn HJ, Hölzel D. The process of metastatisation for breast cancer. *Eur J Cancer*. 2003 Aug;39(12):1794-806.
81. Estourgie SH, Nieweg OE, Valdés Olmos RA, Rutgers EJ, and Kroon BBR. Lymphatic Drainage Patterns From the Breast. *Ann Surg*. 2004 Feb; 239(2): 232–237.

-
82. Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol.* 2007;18(3):581-92.
83. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on day/month/year.
84. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, Forman D, Bray F.. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer.* 2013 Apr;49(6):1374-403.
85. Fiegl M, Haun M, Massoner A, Krugmann J, Müller-Holzner E, Hack R, et al. Combination of cytology, fluorescence in situ hybridization for aneuploidy, and reverse-transcriptase polymerase chain reaction for human mammaglobin/mammaglobin B expression improves diagnosis of malignant effusions. *J Clin Oncol.* 2004;22:474-83.
86. Fine RE, Whitworth PW, Kim JA, Harness JK, Boyd BA, Burak WE. Low-risk palpable breast masses removed using a vacuum-assisted hand-held device. *The Am J of Surg* 186(2003):362-367.

87. Fisher B. Laboratory and clinical research in breast cancer- a personal adventure: the David A. Karnofsky memorial lecture. *Cancer Res* 1980;40(11):3863-74.
88. Fisher B, Anderson S, Bryant J, Margolese RG, Deutsch M, Fisher ER, Jeong JH, Wolmark N. Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N Engl J Med*. 2002 Oct 17;347(16):1233-41.
89. Fisher B, Bauer M, Wickerham DL, Redmond CK, Fisher ER, Cruz AB, et al. Relation of number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. An NSABP update. *Cancer* 1983;52:1551-7.
90. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, Ruby SG, O'Malley F, Simpson JF, Connolly JL, Hayes DF, Edge SB, Lichter A, Schnitt SJ. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med*. 2000 Jul;124(7):966-78. Review.
91. Fleming TP, Watson MA. Mammaglobin, a breast-specific gene, and its utility as a marker for breast cancer. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;923:78-89.
92. Fletcher SW, O'Malley MS, Eart JL, Morgan TM, Lin S, Degnan D. How best to teach women breast self-examination. *Ann Intern Med* 1990; 112:772-779.

-
93. Fonseca E, Nesland JM, Hoie J, Sobrinho-Simoes M. Pattern of expression of intermediate cytokeratin filaments in the thyroid gland: an immunohistochemical study of simple and stratified epithelial-type cytokeratins. *Virchows Arch.* 1997; 430; 239–245.
 94. Franke WW, Shiller DL, Hatzfeld M, Winter S. Protein complexes of intermediate-sized filaments: melting of cytokeratin complexes in urea reveals different polypeptide separation characteristics. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1983; 80; 7113–7117.
 95. Futreal PA, Liu Q, Shattuck-Eidens D et al. BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. *Science* 1994;266:120-2.
 96. Gargano G, Agnese V, Calò V, Corsale S, Augello C, Bruno L, et al. Detection and quantification of mammaglobin in the blood of breast cancer patients: can it be useful as a potential clinical marker? Preliminary results of a GOIM (Gruppo Oncologico dell'Italia Meridionale) prospective study. *Ann Oncol.* 2006;17:vii41 5.
 97. Gatzemeier W, Mann GB. Which sentinel lymph node (SLN) positive breast cancer patient needs an axillary lymph-node dissection (ALND)---ACOSOG Z0011 results and beyond. *Breast.* 2013;22:211-6.

98. Geisler N, Schunemann J, Weber K. Chemical cross-linking indicates a staggered and antiparallel protofilament of desmin intermediate filaments and characterizes one higher-level complex between protofilaments. *Eur. J. Biochem.* 1992; 206; 841–852.
99. Gillanders WE, Mikhitarian K, Hebert R, Mauldin PD, Palesch Y, et al. Molecular detection of micrometastatic breast cancer in histopathology-negative axillary lymph nodes correlates with traditional predictors of prognosis: an interim analysis of a prospective multi-institutional cohort study. *Ann Surg.* 2004 Jun;239(6):828-37; discussion 837-40.
100. Giménez MJ, Fliquete MV, Fuster CA, et al. Linfadenectomía selectiva (ganglio centinela) en el melanoma. Experiencia con 55 casos. *Cir.Esp* 2001; 69: 99-102.
101. Giuliano A.E.; Barth A.M.; Spivack B.; et al. Incidence and predictors of axillary metastasis in T1 carcinoma of the breast. *J.Am Col Surg* 1996;183(3):185-189.
102. Giuliano AE, Kirgan DM, Guenther JM, et al. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. *Ann Surg* 1994;220(3):391-398;discussion 398-401.

103. Giuliano AF. Sentinel Lymphadenectomy in Primary Breast Carcinoma: An Alternative to Routine Axillary Dissection. *Journal of Surgical Oncology* 1996;62:75-77.
104. González-Palacios Martínez, JF. Una nueva modificación en la clasificación TNM del cáncer mamario. *Rev Esp Patolog* 2004;37(3)247-251.
105. Grann VR, Troxel AB, Zojwalla NJ, et al. Hormone receptor status and survival in a population-based cohort of patients with breast carcinoma. *Cancer* 2005; 103:2241.
106. Gropper AB, Calvillo KZ, Dominici L, Troyan S, Rhei E, Economy KE, Tung NM, Schapira L, Meisel JL, Partridge AH, Mayer EL. Sentinel lymph node biopsy in pregnant women with breast cancer. *Ann Surg Oncol*. 2014 Aug;21(8):2506-11. doi: 10.1245/s10434-014-3718-2. Epub 2014 Apr 23.
107. Grünewald K, Haun M, Fiegl M, Urbanek M, Müller-Holzner E, Massoner A, et al. Mammaglobin expression in gynecologic malignancies and malignant effusions detected by nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Lab Invest*. 2002;82:1147-53.
108. Guan XF, Hamedani MK, Adeyinka A, Walker C, Kemp A, Murphy LC, Watson PH, Leygue E. Relationship between mammaglobin expression and estrogen receptor status in breast tumors. *Endocrine* 2003;21:245–50.

109. Guenther JM, Krishnamoorthy M, Tan LR. Sentinel lymphadenectomy for breast cancer in a community managed care setting. *Cancer J Sci Am.* 1997 Nov-Dec;3(6):336-40.
110. Guerra JA, Moreno F. Guía clínica del diagnóstico y tratamiento del cáncer de mama 2007. Sociedad Española de Oncología Médica.
111. Guinee VF, Olsson H, Moller T, Shallenberger RC, van den Blink JW, Peter Z, Durand M, Dische S, Cleton FJ, Zewuster R, et al. The prognosis of breast cancer in males. A report of 335 cases. *Cancer.* 1993 Jan 1;71(1):154-61.
112. Gulec SA, Moffat FL, Carroll RG, et al. Sentinel Lymph Node Localization in Early Breast Cancer. *The Journal of Nuclear Medicine* 1998;39(8):1388-1393.
113. Gusterson BA, Ott R, Anderson TJ, Galea MH, Elston CW, Blamey RW. Occult axillary lymph-node micrometastases in breast cancer. *Lancet* 1990;336:434-5.
114. Györfy B, Hatzis C, Sanft, Hofstatter E, Aktas B, Pusztai L. Multigene prognostic tests in breast cancer: past, present, future. *Breast Cancer Research* (2015) 17:11
115. Haagensen CD, Stout AP. Carcinoma of the breast: criteria of operability. *Ann Surg* 1943;118:1032.

-
116. Haeger K. The illustrated history of surgery. Pag. 82-335. Ed.Raices,S.A. Madrid 1993.
 117. Hakim AA. A mechanism by which human breast carcinoma cells escape the host immune system. *Neoplasma*. 1988;35(6):691-705.
 118. Halsted W. The results of radical operations for the cure of carcinoma of the breast. *Ann Surg* 1907;46:1-19.
 119. 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. *Johns Hopkins Hosp.Rep.*1984-1984;4:297-350.
 120. Han JH, Kang Y, Shin HC, Kim HS, Kang YM, Kim YB, Oh SY. Mammaglobin expression in lymph nodes is an important marker of metastatic breast carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 2003;127:1330-4.
 121. Handley WS. Paraesternal invasion of the thorax in breast cancer and its supression by the use of radium tubes as an operative precaution. *Surg.Gynecol.Obstet* 1927;45:721-782.
 122. Hansen NM, Grube B, YE X, Turner RR,Brenner RJ, Sim MS,, et al. Impact of micrometástasis in the sentinel node of patients with invasive breast cancer. *J Clin Oncol* 2009;27(28):4679-84.

123. Hansen NM, Ye X, Grube BJ, Giuliano AE. Manipulation of the primary breast tumor and the incidence of sentinel node metastases from invasive breast cancer. *Arch Surg*. 2004 Jun;139(6):634-9; discussion 639-40.
124. Hanukoglu I, Fuchs E. The cDNA sequence of a human epidermal keratin: divergence of sequence but conservation of structure among intermediate filament proteins. *Cell* 1982; 31; 243–252.
125. Harris L, Fritsche H, Mennel R, et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25:5287.
126. Hartveit F. *J Pathol*. The routine histological investigation of axillary lymph nodes for metastatic breast cancer. 1984 Jul;143(3):187-91
127. Hellman S, Harris JR. The appropriate breast cancer paradigm. *Cancer Res* 1987;47(2):339-42.
128. Hill ADK, Doyle JM, McDermott EW, et al. Hereditary breast cancer. *Br J Surg* 1997;84:1334-9.

-
129. Houghton RL, Dillon DC, Molesh DA, Zehentner BK, Xu J, Jiang J, Schmidt C, Frudakis A, Repasky E, Maltez Filho A, Nolasco M, Badaro R, et al. Transcriptional complementarity in breast cancer: application to detection of circulating tumor cells. *Mol Diagn* 2001;6:79–91.
130. Houvenaeghel G, Classe JM, GarbayJR, Giard S, Cohen M, Faure C, Hélène C, Belichard C, Uzan S, Hudry D, Azuar P, Villet R, et al. Prognostic value of isolated tumor cells and micrometastases of lymph nodes in early-stage breast cancer: A French sentinel node multicenter cohort study. *Breast*. 2014 Oct;23(5):561-6. doi: 10.1016/j.breast.2014.04.004. Epub 2014 May 27.
131. <http://www.aecc.es/SobreElCancer/CancerPorLocalizacion/CancerMama/prevenccion/Paginas/factoresderiesgo.aspx>
132. <http://esciencenews.com/articles/2008/08/22/women.exposed.negative.life.events.greater.risk.breast.cancer.bgu.study>) Women exposed to negative life events at greater risk of breast cancer: BGU study. Published: Friday, August 22, 2008 - 15:28 in Health & Medicine.
133. http://www.hvn.es/servicios_asistenciales/ginecologia_y_obstetricia/ficheros/actividad_docente_e_investigadora/clases_residentes/2012/clase2012_factores_pronosticos_del_cancer_de_mama.pdf

134. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=3880>
135. Hoda SA, Rosen PP. Practical considerations in the pathologic diagnosis of needle core biopsies of breast. *Am J Clin Pathol* 2002, 118:101-108.
136. Huvos AG, Hutter RV, Berg JW. *Ann Surg.* 1971 Jan;173(1):44-6.). Significance of axillary macrometastases and micrometastases in mammary cancer.
137. Inwald EC, Klinkhammer-Schalke M, Hofstädter F, Zeman F, Koller M, Gerstenhauer M, Ortmann O. Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry. *Breast Cancer Res Treat.* 2013 Jun;139(2):539-52.
138. Isaacs CJD, Peshkin BN, Lerman C. Evaluation and management of women with a strong family history of breast cancer. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK, eds. *Diseases of the Breast.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000:237-54.
139. Ishikawa H, Sato K, Mochizuki H. Optimal Sentinel Node Examination and a New Strategy for Axillary Control in Breast Cancer. *The Breast Journal* 2002;Vol 8(1):10-14.

-
140. Jacobs TW, Connolly JL, Schnitt SJ. Nonmalignant lesions in breast core needle biopsies: to excise or not to excise? *Am J Surg Pathol* 2002, 26:1095-1110.
141. Jatoi I, Hilsenbeck SG, Clark GM, et al. Significance of axillary lymph node metastasis in primary breast cancer. *J Clin Oncol* 1999;8:2334-2340.
142. Kaneko S, Gerasimova T, Butler WM, Cupples TE, Guerry PL, Greene GR, Young SR. The use of FISH on breast core needle samples for the presurgical assessment of HER-2 oncogene status. *Exp Mol Pathol* 2002, 73:61-66.
143. Kerangueven F, Eisinger F, Noguchi T, Allione F, Wargniez V, Eng C, Padberg G, Theillet C, Jacquemier J, Longy M, Sobol H, Birnbaum D. Loss of heterozygosity in human breast carcinomas in the ataxia telangiectasia, Cowden disease and BRCA1 gene regions. *Oncogene*. 1997 Jan 23;14(3):339-47.
144. Kerlikowske K, Grady D, Barclay J, Sickles EA, Ernster VL. Effect of age, breast density and family history on the sensitivity of first screening mammography. *JAMA* 1996; 276: 33-38.
145. Kerlikowske, K. "Efficacy of screening mammography: a meta-analysis. *JAMA* 1995;273:149-154.

146. Khaddage A, Berremila S-A, Forest F, Clemenson A, Bouteille C, Seffert P, et al. Implementation of molecular intra-operative assessment of sentinel lymph node in breast cancer. *Anticancer Res.* 2011;31(2):585-90.
147. Klijanienko J, Coté JF, Thibault F, Zafrani B, Meunier M, Clough K, et al. Ultrasoundguided the needle aspiration cytology of nonpalpable breast lesions. Intitut Curie's experience with 198 histologically correlated cases. *Cancer* 1998; 84: 36-41.
148. Klinge E, Sylvestre YR, Freedberg IM, Blumenberg M. Evolution of keratin genes: different protein domains evolve by different pathways. *J. Mol. Evol.* 1987; 24; 319–329.
149. Klug J, Beier HM, Bernard A, Chilton BS, Fleming TP, Lehrer RI, et al. Uteroglobin/Clara cell 10-kDa family of proteins: nomenclature committee report. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;923:348-54.
150. Kocic B, Filipovic S, Vrbic S, Pejicic I, Rancic N, Cvetanovic A, Milenkovic D. Stressful life events and breast cancer risk: a hospital-based case-control study. *J BUON.* 2015 Mar-Apr;20(2):487-91.
151. Kopan R, Traska G, Fuchs E. Retinoids as important regulators of terminal differentiation: examining keratin expression in individual epidermal cells at various stages of keratinization. *J. Cell Biol.* 1987; 105; 427–440.

-
152. Koscielny S, Tubiana M, Valleron AJ. A simulation model of the natural history of human breast cancer. *Br J Cancer* 1985;52(4):515-24.
 153. Krag DN. Current status of axillary lymph node dissection and sentinel node biopsy in breast cancer. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2010 Jul;8(7):471-3.
 154. Krag DN, Anderson SJ, Julian TB, Brown AM, Harlow SP, Costantino JP, et al. Sentinel-lymph-node dissection compared with conventional axillary-lymph-node dissection in clinically node-negative patients with breast cancer: overall survival findings from the NSABP B-32 randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2010;11:927-33.
 155. Krauss S, Franke WW. Organization and sequence of the human gene encoding cytokeratin 8. *Gene* 1990; 86; 241–249.
 156. Kröger N, Milde-Langosch K, Riiethdorf S, et al. Prognostic and predictive effects of immunohistochemical factors in high-risk primary breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2006; 12:159.
 157. Kruger BM, Burrowes P, MacGregor JH. Accuracy of marker clip placement after mammotome breast biopsy. *Can Assoc Radiol J*. 2002 Jun;53(3):137-40.

158. Kuehn T, Bauerfeind I, Fehm T, Fleige B, Hausschild M, Helms G, *et al.* Sentinel-lymph-node biopsy in patients with breast cancer before and after neoadjuvant chemotherapy (SENTINA): a prospective multicentre cohort study. *Lancet Oncol.* 2013;14:609-18.
159. Kuijt GP, Voogd AC, Van de Poll-Franse LV, Scheijmans LJ, Van Beek MW, Roumen RM. The prognostic significance of axillary lymph-node micrometastases in breast cancer patients. *Eur J Surg Oncol* 2005;31(5):500-5.
160. Lacroix M. Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer.* 2006;13: 1033-67.
161. Lambe M, Hsieh CC, Chan HW, *et al.* Parity, age at first and last birth, and risk of breast cancer: a population-based study in Sweden. *Breast Cancer Research and Treatment* 1996; 38(3):305–311
162. Langley RR, Fidler IJ. Tumor cell-organ microenvironment interactions in the pathogenesis of cancer metastasis. *Endocr Rev.* 2007 May;28(3):297-321. Epub 2007 Apr 4. Review.)
163. Leong SP, Tseng WW. Micrometastatic cancer cells in lymph nodes, bone marrow, and blood: Clinical significance and biologic implications. *CA Cancer J Clin.* 2014 May-Jun;64(3):195-206. doi: 10.3322/caac.21217. Epub 2014 Feb 5.

-
164. Lewison EF. The surgical treatment of breast cancer. *Rec. Adv. Surg.* 1953;34:904-953.
165. Lewison EF. Saint Agatha. *Bull Hist Med* 1950;24:409-420.
166. Li C, Meng S, Yang X, Zhou D, Wang J, Hu J. Sentinel lymph node detection using magnetic resonance lymphography with conventional gadolinium contrast agent in breast cancer: a preliminary clinical study. *BMC Cancer*. 2015 Apr 2;15:213. doi: 10.1186/s12885-015-1255-4
167. Lifrange E, Dondelinger RF, Fridman V, Colin C. En bloc excision of nonpalpable breast lesions using the advanced breast biopsy instrumentation system: an alternative to needle guided surgery? *Eur Radiol* 2001;11:796- 801.
168. Liu LC, Lang JE, Lu Y, Roe D, Hwang SE, Ewing CA, Esserman LJ, Morita E, Treseler P, Leong SP. Intraoperative frozen section analysis of sentinel lymph nodes in breast cancer patients. *Cancer*. 2011 Jan 15;117(2):250-8.
169. Lockett MA, Baron PL, O'Brien PH, et al. Detection of occult breast cancer micrometastases in axillary lymph nodes using a multi-marker reverse transcriptase-polymerase chain reaction panel. *J Am Coll Surg*. 1998;187:9-16.

170. López-Tarruella S, Escudera MJ, Martín M, Jara C, Guerrero A, Lluch A, Santaballa A, Martínez del Prado P, Lao J, Alba E, Fernández A, Andrés R, Llombart A, Batista N, Porras I, López-Vega JM, Adrover E, Calvo L, Pollán M, Carrasco E. Impact on survival of primary tumor resection in women with de novo metastatic breast cancer. (http://www.geicam.org/images/stories/recursos/proyectos-cientificos/estudios_observacionales/El_Alamo_III.pdf). Poster SABCs 2014: The GEICAM Alamo I-III breast cancer registry (1990-2001).
171. Luporsi E, André F, Spyrtos F, Martin PM, Jacquemier J, Penault-Llorca F, Tubiana-Mathieu N, Sigal-Zafrani B, Arnould L, Gompel A, Egele C, Poulet B, Clough KB, Crouet H, Fourquet A, Lefranc JP, Mathelin C, Rouyer N, Serin D, Spielmann M, Haugh M, Chenard MP, Brain E, de Cremoux P, Bellocq JP. Ki-67: level of evidence and methodological considerations for its role in the clinical management of breast cancer: analytical and critical review. *Breast Cancer Res Treat.* 2012 Apr;132(3):895-915.
172. Maddox P, Sasieni P, Szarewski A, Anderson M, Hanby A. Differential expression of keratins 10, 17 and 19 in normal cervical epithelium, cervical intraepithelial neoplasia, and cervical carcinoma. *J. Clin. Pathol.* 1999; 52; 41–46.
173. Madigan MP, Ziegler RG, Benichou J, Byrne C, Hoover RN. Proportion of breast cancer cases in the United States explained by well-established risk-factors. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87(22):1681-5.

-
174. Malzahn K, Mitze M, Thoenes M, Moll R. Biological and prognostic significance of stratified epithelial cytokeratins in infiltrating ductal breast carcinomas. *Virchows Arch.* 1998; 433; 119–129.
175. Marchbanks PA, McDonald JA, Wilson HG, Folger SG, Mandel MG, Daling JR, Bernstein L, Malone KE, Ursin G, Strom BL, Norman SA, Wingo PA, Burkman RT, Berlin JA, Simon MS, Spirtas R, Weiss LK. Oral contraceptives and the risk of breast cancer. *N Engl J Med.* 2002 Jun 27;346(26):2025-32.
176. Marchetti A, Buttitta F, Bertacca G, Zavaglia K, Bevilacqua G, Angelucci D, Viacava P, Naccarato A, Bonadio A, Barassi F, Felicioni L, Salvatore S, *et al.* mRNA markers of breast cancer nodal metastases; comparison between mammaglobin and carcinoembryonic antigen in 248 patients. *J Pathol* 2001;195:186-90.
177. Martín M, González Palacios F, Cortés J, de la Haba J, Schneider J. Prognostic and predictive factors and genetic analysis of early breast cancer. *Clin Transl Oncol.* 2009 Oct;11(10):634-42. Review.
178. Martín M, Mahillo E, Llombart-Cussac A, Lluch A, Munarriz B, Pastor M *et al.* The “El Álamo” Project (1990-1997): two consecutive hospital-based Studies of breast cancer outcomes in Spain. *Clin Transl Oncol* 2006; 8(7):508-18.

179. Mason BH, Holdaway IM, Mullins PR, Yee LH, Kay RG. Progesterone and estrogen receptors as prognostic variables in breast cancer. *Cancer Res.* 1983 Jun;43(6):2985-90.
180. Mathiesen O, Carl J, Bonderup O, Panduro J. Axillary sampling and the risk of erroneous staging of breast cancer. An analysis of 960 consecutive patients. *Acta Oncol.* 1990;29(6):721-5.
181. Mavaddat N, D P Pharoah P, Michailidou K, Tyrer J, *et al.* Prediction of breast cancer risk based on profiling with common genetic variants. *JNCI J Natl Cancer Inst* (2015) 107 (5): djv036 doi:10.1093/jnci/djv036.
182. McDonald JJ, Haagensen CD, Stout AP. Metastasis from mammary carcinoma to the supraclavicular and internal mammary lymph nodes. *Surgery.* 1953 Sep;34(3):521-42.
183. McLachlan AD. Coiled coil formation and sequence regularities in the helical regions of alpha-keratin. *J. Mol. Biol.* 1978; 124; 297–304.
184. McMasters KM, Tuttle TM, Carlson DJ, *et al.* Sentinel lymph node biopsy for breast cancer: a suitable alternative to routine axillary dissection in multi-institutional practice when optimal technique is used. *Journal of Clinical Oncology*, Vol 18, n° 13 July 2000: 2560-2566.

-
185. McPherson K, Steel CM, Dixon JM. Breast cancer: epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ*. 2000 Sep 9;321(7261):624-628.
 186. Meade RH. An introduction to the history of general surgery. W.B. Saunders Co, Filadelfia 1968.
 187. Mehta TS. Current uses of ultrasound in the evaluation of the breast. *Radiol Clin N Am* 341(2003):841-856.
 188. Mitas M, Mikhitarian K, Walters C, et al. Quantitative Real-Time RT-PCR detection of breast cancer micrometastasis using a multigene marker panel. *Int J Cancer*. 2001;93:162-171.
 189. Moll R. Cytokeratins as markers of differentiation in the diagnosis of epithelial tumors. In Herrmann H, Harris JR eds. *Intermediate filaments. Subcellular Biochem.* 31; New York: Plenum Press, 1998; 205–261.
 190. Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: pattern of expression in normal epithelia, tumor and culture cells. *Cell* 1982; 31; 11–24.

191. Mook S, Schmidt MK, Viale G, Pruneri G, Eekhout I, Floore A, et al. The 70-gene prognosis-signature predicts disease outcome in breast cancer patients with 1-3 positive lymph nodes in an independent validation study. *Breast Cancer Res Treat.* 2009;116:295–302.
192. Morton DL, Wen DR, Wong JH, et al. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg.*1992;127:392-399.
193. Mucientes Rasilla J, Farge Balbín L, Cardona Arboniés J, Moreno Elola-Olaso A, Delgado-Bolton R, Izarduy Pereyra L, Rodríguez Rey C, Lapeña Gutiérrez L, González Maté A, Román Santamaría JM, Carreras Delgado JL. SPECT-CT: a new tool for localisation of sentinel lymph nodes in breast cancer patients]. *Rev Esp Med Nucl.* 2008 May-Jun;27(3):183-90.
194. Nano MT, Kollias J, Farshid G, et al. Clinical impact of false-negative sentinel node biopsy in primary breast cancer. *British Journal of Surgery* 2002,89:1430-1434.
195. Naomi P, Dennis E, Lorie A, et al. Lymphoscintigraphy, the sentinel node concept, and the intraoperative gamma probe in melanoma, breast cancer, and other potential cancers. *Seminars in Nuclear Medicine*1997,Vol 27,No 1.:55-67.
196. Neville AM. Breast cancer micrometastases in lymph nodes and bone marrow are prognostically important. *Ann Oncol* 1991;2:13-4.

197. Ni J, Kalf-Suske M, Gentz R, Schageman J, Beato M, Klug J. All human genes of the uteroglobin family are localized on chromosome 11q12.2 and form a dense cluster. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;923:25-42.
198. Niehans GA, Singleton TP, Dykoski D, Kiang DT. Stability of HER-2/neu expression over time and at multiple metastatic sites. *J Natl Cancer Inst.* 1993 Aug 4;85(15):1230-5.
199. NIH consensus conference. Treatment of early-stage breast cancer. *JAMA* 1991; 265:391
200. Noguchi M. Sentinel lymph node biopsy and breast cancer. *British Journal of Surgery* 2002, 89:21-34.
201. Noguchi S, Aihara T, Motomura K, et al. Detection of breast cancer micrometastases in axillary lymph nodes by means of RT-PCR. Comparison between MUC1 mRNA and keratin 19 mRNA amplification. *Am J Pathol.* 1996;148:649-656.
202. Norton L, Simon R. Tumor size, sensitivity to therapy, and design of treatment schedules. *Cancer Treat Rep* 1977;61(7):1307-17.

203. Núñez Villar MJ, Martínez Arribas F, Pollán M, Lucas AR, Sánchez J, Tejerina A, Schneider J. Elevated mammaglobin (h-MAM) expression in breast cancer is associated with clinical and biological features defining a less aggressive tumour phenotype. *Breast Cancer Res* 2003;5(3):65-70.
204. O'Brien N, Maguire TM, O'Donovan N, Lynch N, Hill ADK, McDermott E, et al. Mammaglobin A: a promising marker for breast cancer. *Clin Chem*. 2002;48:1362-4.
205. O'Brien NA, O'Donovan N, Ryan B, Hill ADK, McDermott E, O'Higgins N and Duffy MJ. Mammaglobin a in breast cancer: Existence of multiple molecular forms. *Int. J. Cancer*: 114, 623–627 (2005).
206. O'Higgins N, Linos DA, Blichert-Toft M, Cataliotti L, de Wolf C, Rochard F, et al. European guidelines for quality assurance in the surgical management of mammographically detected lesions. *Ann Chir Gynaecol* 1998;87:110-112. European Breast Cancer Working Group.
207. Osborn M, Weber K. Intermediate filament proteins: a multigene family distinguishing major cell lineages. *Trends Biochem*. 1986; 11; 461–472.
208. Otterbach F, Bankfalvi A, Bergner S, Decker T, Krech R, Boecker W. Cytokeratin 5/6 immunohistochemistry assists the differential diagnosis of atypical proliferation of the breast. *Histopathology* 2000; 37; 232–240.

-
209. Ouellette RJ, Richard D, Maicas E. RT-PCR for mammaglobin genes, MGB1 and MGB2, identifies breast cancer micrometastasis in sentinel lymph nodes. *Am J Clin Pathol* 2004;121:637-643.
210. Page DL. Prognosis and breast cancer. Recognition of lethal and favourable prognostic types. *Am J Surg Pathol* 1991; 15:334.
211. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node negative breast cancer. *N Engl J Med.* 2004;351:2817–26.
212. Palazzo J. Rapid molecular assay for detection of nodal metastases has higher sensitivity compared to frozen section intra-operative histology in subjects with different types of invasive breast carcinomas. Poster presented at: The San Antonio Breast Cancer Symposium; San Antonio, Texas; December 14-17; 2006.
213. Park HL, Hong J. Vacuum-assisted breast biopsy for breast cancer. *Gland Surg.* 2014 May;3(2):120-7. doi: 10.3978/j.issn.2227-684X.2014.02.03.
214. Parker SH, Lovin JD, Jobe WE, Burke BJ, Hopper KD, Yakes WF. Nonpalpable breast lesions: steotactic automated large-core biopsies. *Radiology.* 1991;180:403-407.

215. Parkin DM, Fernández LM. Use of statistics to assess the global burden of breast cancer. *Breast J* 2006; 12 Suppl 1:S70-S80.
216. Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Storm H. *Cancer Incidence in Five Continents*, volume X. 2014. IARC Scientific Publication No. 164. Lyon IARC Press.
217. Patani N, Mokbel K. The clinical significance of sentinel lymph node micrometastases in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2009;114:393-402.
218. Piñero A, Giménez J, Merck B, Vázquez C, et al. Consensus meeting about sentinel lymph node selective biopsy in breast cancer. *Spanish Society of Senology and Breast Pathology. Rev Esp Patol* 2007; Vol 40, nº 2:91-95.
219. Pollán M, García-Mendizabal M^oJ, Pérez-Gómez B, Aragonés N, Lope V, Pastor R, Ramis R, Fernández P, García-Pérez J, Vidal E, Boldo E, Pérdomo S. y López-Abente G. Situación Epidemiológica del Cáncer de Mama en España. Área de Epidemiología Ambiental y Cáncer. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. *Psicooncología*. Vol. 4, Num. 2-3, 2007, pp. 231-248.
220. Ponce ML, Hibino S, Lebioda AM, Mochizuki M, Nomizu M, Kleinman HK. Identification of a potent peptide antagonist to an active laminin-1 sequence that blocks angiogenesis and tumor growth. *Cancer Res*. 2003 Aug 15;63(16):5060-4.

-
221. Popescu NC, Bowden PE, DiPaolo JA. Two type II keratin genes are localized on human chromosome 12. *Hum. Genet.* 1989; 82; 109–112.
222. Prat A, Parker JS, Fan C, Cheang MC, Miller LD, Bergh J, et al. Concordance among gene expression-based predictors for ER-positive breast cancer treated with adjuvant tamoxifen. *Ann Oncol.* 2012;23:2866–73.
223. Pujol P, Hilsenbeck SG, Chamness GC, Elledge RM. Rising levels of estrogen receptor in breast cancer over 2 decades. *Cancer.* 1994 Sep 1;74(5):1601-6.
224. Rahbar G, Sie AC, Hansen GC, Prince JS, Melany ML, Reynolds, HE, Jakson VP, Sayre JW, Bassett LW. Beningn versus Malignant Solid Breast Masses: US Differentiation. *Radiology* 1999;213:889-894.
225. Regidor E, Gutiérrez-Fisac JL. La salud de la población española en el contexto europeo y en el Sistema Nacional de Salud. *Indicadores de salud.* Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo, 2005.
226. Reintgen D, Cruse W, Wells K, et al. The oderly progression of melanoma nodal metastases. *Annals of Surgery* 1994;Vol 220.No 6:759-767.
227. Rodríguez Garrido M, Asensio del Barrio C. PET-TAC: Indicaciones, Revisión sistemática y Meta -análisis. AETS-Instituto de Salud Carlos III, Madrid 2004.

228. Romano V, Bosco P, Rocchi M et al. Chromosomal assignments of human type I and type II cytoke­ratin genes to different chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.* 1988; 48; 148–151.
229. Rosen EL, Vo TT. Metallic clip deployment during stereotactic breast biopsy: retrospective analysis. *Radiology.* 2001;218:510-516.
230. Rosen PP, Lesser ML, Kinne DW, Beatlle EJ. Discontinuous or “skip” metastases in breast carcinoma. Analysis of 1228 axillary dissections. *Ann Surg.* 1983 Mar;197(3):276-83.
231. Rosenberg M, Fuchs E, Le Beau MM, Eddy RL, Shows TB. Three epidermal and one simple epithelial type II keratin genes map to human chromosome 12. *Cytogenet. Cell Genet.* 1991; 57; 33–38.
232. Rovera F, Fachinetti A, Rausei S, Chiappa C, Lavazza M, Arlanti V, Marelli M, Boni L, Dionigi G, Dionigi R. Prognostic role of micrometastases in sentinel lymph node in patients with invasive breast cancer. *Int J Surg.* 2013;11 Suppl 1:S73-8. doi: 10.1016/S1743-9191(13)60022-9.
233. Russo J, Moral R, Balogh GA, Mailo D, Russo IH. The protective role of pregnancy in breast cancer. *Breast Cancer Research* 2005; 7(3):131–142.

-
234. Rydén L, Chebil G, Sjöström L, Pawlowski R, Jönsson. Determination of sentinel lymph node (SLN) status in primary breast cancer by prospective use of immunohistochemistry increases the rate of micrometastases in isolated tumour cells. Analysis of 174 patients after sentinel node biopsy. *EJSO* 2007;33:33-38.
235. Saez RA, McGuire WL, Clark CM, Prognostic factors in breast cancer. *Semin Surg Oncol* 1989;5:102-10.
236. Sahin AA, Guray M, Hunt KK. Identification and biologic significance of micrometastases in axillary lymph nodes in patients with invasive breast cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2009;133:869-78.
237. SaKorafas G, Tsiotou A. Sentinel lymph node biopsy in breast cancer. *Am Surg* 2000;66:667-674.
238. Sasaki E, Tsunoda N, Hatanaka Y, Mori N, Iwata H, Yatabe Y. Breast-specific expression of MGB1/mammaglobin: an examination of 480 tumors from various organs and clinicopathological analysis of MGB1-positive breast cancers. *Mod Pathol.* 2007;20:208-14.
239. Schem C, Maass N, Bauerschlag DO, Carstensen MH, 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.

240. Schindlbeck C, Janni W, Shabani N, Rack B, Gerber B, Schmitt M, Harbeck N, Sommer H, Braun S, Friese K. Comparative analysis between the HER2 status in primary breast cancer tissue and the detection of isolated tumor cells in the bone marrow. *Breast Cancer Res Treat.* 2004 Sep;87(1):65-74
241. Schwartz GF, Giuliano AE, Veronesi H, et al. Proceedings of the Consensus Conference on the Role of Sentinel Lymph Node Biopsy in Carcinoma of the Breast, April 19- 22, 2001, Philadelphia, USA. *The Breast Journal*, Volume 8, Number 3, 2002:126-138.
242. Schweizer J, Bowden PE, Coulombe PA, Langbein L, Lane EB, Magin TM, Maltais L, Omary MB, Parry DA, Rogers MA, Wright MW (July 2006). "New consensus nomenclature for mammalian keratins. *J Cell Biol* 174 (2): 169–74.
243. <http://www.seaocongresos.com/2007/clubes/mama/rezoladg.html>
244. Sentís M, y Camps J. Mama. En *RM de cuerpo*. Martí-Bonmatí L (Ed). Barcelona. Edikamed. 2005. 39-52.
245. Serra-Majem L, Ribas L, Lloveras G, Saleras L. Changing patterns on fat consumption in Spain. *Eur J Clin Nutr* 1993; 47 Suppl 1:S13-S20.
246. Shaaban AM, Sloane JP, West CR, Moore FR, Jarvis C, Williams EM, Foster CS. Histopathologic types of benign breast lesions and the risk of breast cancer: case-control study. *Am J Surg Pathol* 2002 Apr;26(4):421-30.

-
247. Shin HJ, Kim HH, Cha JH. Current status of automated breast ultrasonography. *Ultrasonography*. 2015 Mar 23. doi: 10.14366/usg.15002. [Epub ahead of print].
248. Silva AL, Tomé MJ, Correia AE, Passos-Coelho JL. Human mammaglobin RT-PCR assay for detection of occult breast cancer cells in hematopoietics products. *Ann Oncol* 2002;13:422-429.
249. Silverstein M.J.; Gierson E.D. Waisman J.R.; et al. Axillary lymph node dissection for T1a breast carcinoma: is it indicated? *Cancer* 1994;73:664- 667.
250. Sjödin A, Guo D, Hofer PA, Henriksson R, Hedman H. Mammaglobin in normal human sweat glands and human sweat gland tumors. *J Invest Dermatol*. 2003;121:428-9.
251. Sjödin A, Guo D, Lund-Johansen M, Krossnes BK, Lilleng P, Henriksson R, et al. Secretoglobins in the human pituitary: high expression of lipophilin B and its down-regulation in pituitary adenomas. *Acta Neuropathol*. 2005;109: 381-6.
252. Slawson SH and Johnson, BA. Ductography: How To and What If? *Radiographics* 2001;21:133-150.
253. Smith JA 3rd, Gamez-Araujo JJ, Gallager HS, White EC, McBride CM. Carcinoma of the breast: analysis of total lymph node involvement versus level of metastasis. *Cancer*. 1977 Feb;39(2):527-32.

254. Snook KL, Layer GT, Jackson PA, de Vries CS, Shousa S, Sinnett HD, et al. Multicentre evaluation of intraoperative molecular analysis of sentinel lymph nodes in breast carcinoma. *Br J Surg.* 2011;98(4):527-35.
255. Sociedad Española de Anatomía Patológica.
256. Sotiriou C, Pusztai L. Gene-expression signatures in breast cancer. *N Engl J Med.* 2009;360:790–800.
257. Sotiriou C, Wirapati P, Loi S, Harris A, Fox S, Smeds J, et al. Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. *J Natl Cancer Inst.* 2006;98:262–72.
258. Span PN, Waanders E, Manders P, Heuvel JM, Foekens JA, Watson MA, Beex LM, Sweep FJ. Mammaglobin is associated with low grade, steroid receptor-positive breast tumours from postmenopausal patients, and has independent prognostic value for relapse-free survival time. *J Clin Oncol* 2004;22:691– 698.
259. Speer JF, Petrosky VE, Retsky MW, Wardwell RH. A stochastic numerical model of breast cancer growth that simulates clinical data. *Cancer Res* 1984;44(9):4124-30.
260. Spratt JA, von Fournier D, Spratt JS, Weber EE. Decelerating growth and human breast cancer. *Cancer* 1993;71(6):2013-9.

-
261. Stanley P, Ina Steinmetz MD, Fahim A, et al. Optimal selective sentinel lymph node dissection in primary malignant melanoma. *Arch Surg.*1997 Vol.132:666-673.
262. Steinert PM, Idler WW, Zimlichman S. Self-assembly of bovine epidermal keratin filaments in vitro. *J. Mol. Biol.* 1976; 108:547–567.
263. Steinert PM, Idler WW, Zhou XM et al. Structural and functional implications of amino acid sequences of keratin intermediate filament subunits. *Ann. NY Acad. Sci.* 1985; 455; 451–461.
264. Steinert PM, Liem RK. Intermediate filament dynamics. *Cell* 1990; 60; 521–523.
265. Steinert PM, Roop DR. Molecular and cellular biology of intermediate filaments. *Annu. Rev. Biochem.* 1988; 57; 593– 625.
266. Suchy B, Austrup F, Driesel G, Eder C, Kusiak I, Uciechowski P, et al. Detection of mammaglobin expressing cells in blood of breast cancer patients. *Cancer Lett.* 2000;158:171-8.
267. Sun TT, Eichner R, Nelson WG et al. Keratin classes: molecular markers for different types of epithelial differentiation. *J. Invest. Dermatol.* 1983; 81; 109s–115s.

268. Sun TT, Green H. Immunofluorescent staining of keratin fibers in cultured cells. *Cell* 1978; 14; 469–476.
269. Tabar L.; Duffy S.W.; Vitak B.; et al. The natural history of breast carcinoma: what have we learned from screening? *Cancer* 1999;86(3):449-462.
270. Talantov D, Baden J, Jatkoe T, Hahn K, Yu J, Rajpurohit Y, et al. A quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay to identify metastatic carcinoma tissue of origin. *J Mol Diagn.* 2006;8:320-9.
271. Taucher S, Rudas M, Mader RM, et al. Do we need HER-2/neu testing for all patients with primary breast carcinoma? *Cancer* 2003; 98:2547.
272. Tot T. Patterns of distribution of cytokeratins 20 and 7 in special types of invasive breast carcinoma: a study of 123 cases. *Ann. Diagn. Pathol.* 1999; 3; 350–356.
273. Treseler P. Pathologic examination of the sentinel lymph node: what is the best method? *Breast J* 2006;12(5 Suppl2):S143-51.
274. Treseler PA and Tauchi PS. Pathologic Analysis of the Sentinel Lymph Node. *Surg Clin North Am* 2000;80(6):1695-1719.

-
275. Truong PT, Lesperance M, Li KH, MacFarlane R, Speers CH, Chia S. Micrometastatic node-positive breast cancer: long-term outcomes and identification of high-risk subsets in a large population-based series. *Ann Surg Oncol* 2010;17(8):2138-46.
276. Tsujimoto M, Kakabayashi 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.
277. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med.* 2002;347:1999–2009.
278. Van la Parra RF, de Roos WK, Contant CM, Bavelaar-Croon CD, Barneveld PC, Bosscha K. A prospective validation study of sentinel lymph node biopsy in multicentric breast cancer: SMMaC trial. *Eur J Surg Oncol.* 2014 Oct;40(10):1250-5. doi: 10.1016/j.ejso.2013.11.004. Epub 2014 Feb 13.
279. Verdecchia A, Francisci S, Brenner H, Gatta G, Micheli A, Mangone L et al. Recent cancer survival in Europe: a 2000-02 period analysis of EURO CARE-4 data. *Lancet Oncol* 2007: 8(9):784-96.

280. Veronesi U, Paganelli G, Viale G, et al. A Randomized Comparison of Sentinel-Node Biopsy with Routine Axillary Dissection in Breast Cancer. *N Engl Med* 2003;349:546-553.
281. Viale G, Dell'Orto P, Biasi MO, Stufano V, De Brito Lima LN, Paganelli G, Maisonneuve P, Vargo JM, Green G, Cao W, Swijter A, Mazzarol G. Comparative evaluation of an extensive histopathologic examination and a real-time reverse-transcription-polymerase chain reaction assay for mammaglobin and cytokeratin 19 on axillary sentinel lymph nodes of breast carcinoma patients. *Ann Surg.* 2008 Jan;247(1):136-42.
282. Vidal-Sicart S, Valdés Olmos R. Sentinel node mapping for breast cancer: current situation. *J Oncol.* 2012;2012:361341. doi: 10.1155/2012/361341. Epub 2012 Aug 15.
283. Visser M, Jiwa M, Horstman A, Brink AA, 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(11):2562-7.
284. Vizcaino I, Gadea L, Andreo L, Salas D, Ruiz-Perales F, Cuevas D et al. Short-term Follow-up Results in 795 Nonpalpable Probably Benign Lesions Detected at Screening Mammography. *Radiology* 2001; 219: 475-483.

-
285. Wang HH, Ducatman BS. Fine needle aspiration of the breast. A probabilistic approach to diagnosis of carcinoma. *Acta Cytol* 1998;42:285-289.
286. Warmuth MA, Bowen G, Prosnitz LR, et al. Complications of axillary lymph node dissection for carcinoma of the breast: a report based on a patient survey. *Cancer* 1998;83(7):1362-1368.
287. Watson MA, Darrow C, Zimonjic DB, Popescu NC, Fleming TP. Structure and transcriptional regulation of the human mammaglobin gene, a breast cancer associated member of the uteroglobin gene family localized to chromosome 11q13. *Oncogen*. 1998;16:817-24.
288. Watson MA, Dintzis S, Darrow CM, Voss LE, DiPersio J, Jensen R, Fleming TP. Mammaglobin expresión in primary, metastatic and occult breast cancer. *Cancer Res* 1999;59:3028-3031.
289. Watson MA, Fleming TP. Isolation of differentially expressed tags from human breast cancer. *Cancer Res*. 1994;54:4598-602.
290. Watson MA, Fleming TP. Mammaglobin, a mammary-specific member of the uteroglobin gene family, is overexpressed in human breast cancer. *Cancer Res*. 1996;56:860-5.

291. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastases-correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991;324(1):1-8.
292. Weaver DL. Pathology evaluation of sentinel lymph nodes in breast cancer: recommendations and rationale. *Mod. Pathol* 2010;23:26-32.
293. Weaver DL, Ashikaga T, Krag DN, et al. Effect of occult metastases on survival in node-negative breast cancer. *New Eng J of Medicine* 2011;364:412-21.
294. Willet WC, Rockhill B, Hankinson SE, et al. Epidemiology and nongenetic causes of breast cancer. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK, eds. *Diseases of the Breast*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000:175-220.
295. Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potencial. *Lancet Oncol*. 2010;11(2):174.
296. Zafrazas M, Petschke B, Donner A, Fritzsche F, Kristiansen G, Knüchel R, Dahl E. Expression analysis of mammaglobin A (SCGB2A2) and lipophilin B (SCGB1D2) in more than 300 human tumors and matching normal tissues reveals their co-expression in gynecologic malignancies. *BMC Cancer* 2006;6:88.

297. Zehentner BK, Carter D. Mammaglobin: a candidate diagnostic marker for breast cancer. *Clin Chem* 2004;37:249-257.
298. Zehentner BK, Dillon DC, Jiang Y, Xu J, Bennington A, Molesh DA, Zhang X, Reed SG, Persing D, Houghton RL. Application of a multigene reverse transcription-PCR assay for detection of mammaglobin and complementary transcribed genes in breast cancer lymph nodes. *Clin Chem* 2002;48(8):1225-1231.

ANEXOS

INFORMACIÓN PARA LA PACIENTE Y FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Hospital Clínico San Carlos
Laboratorio de Genómica.
Servicio de Análisis Clínicos.

La paciente _____, de _____ años de edad, con DNI/NIE _____, tras haber sido informada por el Dr./Dra. _____, con número de colegiado _____, declara que se la ha suministrado y que a través de este documento ha podido leer y ha comprendido la información correspondiente a la participación en el Estudio llevado a cabo en el Hospital Clínico San Carlos sobre la detección molecular de micrometástasis en ganglio centinela.

INTRODUCCIÓN

Por la presente le invitamos a participar en un estudio de investigación. Para decidir si desea o no participar en este estudio usted tiene derecho a saber cuál es el objetivo del mismo, cuál es la selección de los pacientes, los procedimientos que se emplearán y los riesgos que conllevaría.

OBJETIVO

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. Las metástasis y la invasión por células cancerosas se detectan en este ganglio y son la principal causa de morbi-mortalidad relacionadas con el cáncer de mama. El poder desarrollar técnicas moleculares que permitan la detección precoz de las metástasis axilares ha sido el objetivo de muchas investigaciones.

Con este estudio se pretende valorar la sensibilidad, la especificidad y el valor predictivo de las técnicas moleculares en el manejo del cáncer de mama.

PROCEDIMIENTO

Se utilizarán muestras recogidas de mujeres diagnosticadas de cáncer de mama en estadio I y II, que fueran candidatas a la técnica de biopsia del ganglio centinela y cuyas muestras de tejido fueron evaluadas durante el acto intraoperatorio de hematoxilina-eosina y por medio de inmunohistoquímica.

El RNA obtenido y almacenado de estas muestras será empleado en la realización de las técnicas moleculares a valorar en este estudio.

Mediante la firma de este documento, la paciente da su aprobación para la utilización de sus muestras biológicas en dicho estudio, así como para la utilización de la información contenida en su Historia Clínica, con la única y exclusiva finalidad de presentar la mayor disponibilidad de datos posible en la investigación.

Los datos obtenidos serán manejados con la máxima confidencialidad y de acuerdo con la ley 15/99 de Protección de Datos de Carácter Personal.

AUTORIZO a que el personal médico utilice, para fines de investigación, las muestras obtenidas durante mi intervención y la información incluida en mi historia clínica.

Me reservo expresamente el derecho de revocar mi consentimiento en cualquier momento, sin necesidad de explicar los motivos y sin que ello repercuta en mis cuidados médicos.

En Madrid a _____(LUGAR Y FECHA).

LA PACIENTE

EL INVESTIGADOR

DNI/NIE:

Nº DE COLEGIADO:

REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO

A través de la siguiente firma, la paciente _____, con DNI/NIE _____ desestima su participación en la investigación realizada en el Hospital Clínico San Carlos sobre la detección molecular de micrometástasis en ganglio centinela, así como desautoriza la utilización de la información contenida en su Historia Clínica para dicho estudio.

En Madrid a _____(LUGAR Y FECHA).

LA PACIENTE

EL INVESTIGADOR

DNI/NIE:

Nº DE COLEGIADO:



**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^º 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^º 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