

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**  
**Departamento de Obstetricia y Ginecología**



**ESTUDIO BIOMOLECULAR A TIEMPO REAL  
DEL GANGLIO CENTINELA EN CARCINOMA DE  
MAMA.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**  
**PRESENTADA POR**

**Miriam de la Puente Yagüe**

Bajo la dirección de los doctores

Fernando Bullón Sopelana  
Marta Vidaurreta Lázaro

**Madrid, 2011**

**ISBN: 978-84-694-3403-1**

© Miriam de la Puente Yagüe, 2011

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Hospital Universitario Clínico “San Carlos”

Facultad de Medicina

Departamento de Obstetricia y Ginecología



**ESTUDIO BIOMOLECULAR A TIEMPO REAL DEL  
GANGLIO CENTINELA EN CARCINOMA DE MAMA  
(TESIS DOCTORAL)**

Miriam de la Puente Yagüe

Madrid, 2010

UNIVERSIDAD: Universidad Complutense de Madrid

FACULTAD Y DEPARTAMENTO:

Facultad de Medicina.

Departamento de Obstetricia y Ginecología.

Hospital Universitario Clínico “San Carlos”

TÍTULO: Estudio biomolecular a tiempo real del ganglio centinela  
en carcinoma de mama.

AUTORA: Miriam de la Puente Yagüe.

DIRECTORES DE TESIS:

Dr. José María Román Santamaría.

Dra. Aranzazu Moreno Elola-Olaso.

Prof. José Antonio Vidart Aragón.

*A mi Familia y a Fernando.*

*“Comienza haciendo lo necesario, después lo que es posible y, de repente, estarás  
haciendo lo imposible”. San Francisco de Asís.*

## ***AGRADECIMIENTOS***

Me gustaría expresar mi más sincera gratitud a todas aquellas personas que han participado, de alguna manera, en la realización de esta tesis doctoral. Sin su colaboración no podría haberse realizado de forma alguna.

Deseo reseñar con especial cariño e inmensa gratitud a las siguientes personas:

A la Dra. Aranzazu Moreno Elola-Olaso, profesora asociada de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid y médico adjunto de la Sección de Patología Mamaria del Servicio de Ginecología del Hospital Clínico San Carlos, directora de esta Tesis, por su dedicación continua y su entrega incondicional. Gracias por siempre disponer de tiempo para hablar, de paciencia para escuchar y de maestría para enseñar.

Al Dr. José María Román Santamaría, profesor asociado de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid y Jefe de Sección de Patología Mamaria del Servicio de Ginecología del Hospital Clínico San Carlos, director de esta Tesis. Gracias por la confianza sin límites y por la sabiduría magistral que muestra en cada acción realizada.

Al Prof. José Antonio Vidart Aragón, catedrático de Ginecología y Obstetricia de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, Jefe de Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Clínico San Carlos, co-director de esta Tesis. Mi agradecimiento eterno por el gran honor de haberme permitido recibir parte del conocimiento que posee, junto a su gran equipo, y, de este modo, haber iniciado mi formación dentro del amplio mundo de la patología femenina.

A todos los compañeros pertenecientes a la Sección de Patología Mamaria del Servicio de Ginecología del Hospital Clínico San Carlos, puesto que, gracias a su trabajo diario y saber hacer se consigue el tratamiento idóneo de un gran número de pacientes que cada día pueden disfrutar con sus familias de la vida.

A la Dra. María Eugenia Olivares, parte indispensable de la Unidad de Patología Mamaria. Imprescindible no sólo para las pacientes sino también para sus compañeros. Gracias por la aportación incondicional de la sonrisa diaria y por tus amplios conocimientos tanto de la paciente oncológica como de la ciencia en general.

Agradecer a la Dra. Maestro y a todo el equipo del laboratorio de Genómica (Marta Vidaurreta, Silvia Vengazones, Sara Rafael y Virginia de la Orden) la realización de un trabajo desempeñado de manera tan desinteresada, sin este equipo el desarrollo de este trabajo hubiese sido imposible. Al igual que al Dr. Furió y al Servicio de Anatomía Patológica y, por otra parte, al Profesor Carreras y al Servicio de Medicina Nuclear, sin su colaboración este proyecto no se podría haber llevado a cabo, gracias por su inmensa participación.

A la Fundación para la investigación Biomédica del Hospital Clínico San Carlos, por la concesión de la Beca Predoctoral, sin la cual este estudio no se podría haber iniciado.

Mi más especial agradecimiento a todos mis amigos, que han puesto en mi mano el bastón con el que continuar mi andanza en este proyecto tan especial en mi vida.

Finalmente, gracias a mi Gran Familia, porque sin ellos cualquier camino se vuelve de una inclinación inabordable, pero con su apoyo el sendero más empedrado se vuelve liso y accesible. Sin vosotros no soy nada, con vosotros soy lo que mis sueños me orienten a ser.

## *ÍNDICE*

<b>ÍNDICE</b>	.....	1
 <b>INTRODUCCIÓN</b>		
I.	Epidemiología .....	4
II.	Factores de riesgo .....	7
III.	Prevención y diagnóstico del cáncer de mama .....	11
IV.	Factores pronóstico .....	17
V.	Medidas terapéuticas de la neoplasia mamaria .....	18
VI.	Técnica de biopsia selectiva de ganglio centinela .....	22
VII.	Inmunohistoquímica en el carcinoma mamario .....	30
VIII.	Técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) en el ganglio centinela .....	33
IX.	Clasificación molecular del cáncer de mama .....	38
 <b>OBJETIVOS</b> .....		
 <b>PACIENTES</b>		
I.	Periodo de estudio .....	41
II.	Población de estudio .....	41
	II.1. Criterios de inclusión de la población .....	42
	II.2. Criterios de exclusión .....	42

## **MÉTODOS**

I.	Metodología clínica .....	45
II.	Método de localización del ganglio centinela .....	53
III.	Método quirúrgico .....	56
IV.	Método de análisis de ganglio centinela y pieza tumoral .....	58
	IV.1. Estudio por hematoxilina-eosina e inmunohistoquímica ...	58
	IV.2. Metodología biomolecular (Determinación de marcadores mediante la técnica de RT-PCR) .....	62
	IV.2.a. Procesamiento de muestras .....	62
	IV.2.b. Técnica RT-PCR convencional .....	64
	IV.2.c. Técnica RT-PCR a tiempo real .....	68
V.	Metodología estadística .....	74

## **RESULTADOS**

I.	Estudio descriptivo .....	78
II.	Estudio analítico de los factores pronóstico .....	100
	II.1. Relación de los factores pronóstico conocidos con el resultado de la RT-PCR .....	100
	II.2. Relación de los factores pronóstico con la variable recidiva .....	104
III.	Validación de la técnica RT-PCR .....	107

---

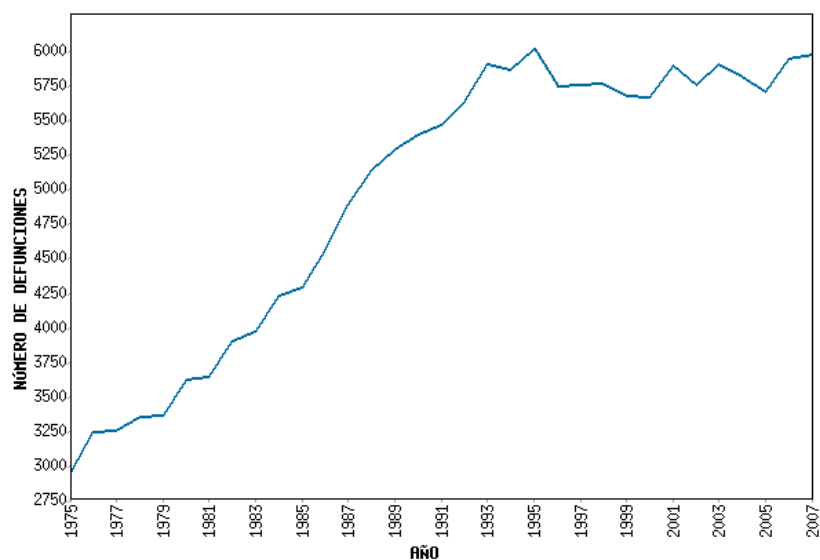
IV.	Estudio de supervivencia libre de enfermedad .....	110
	IV.1. Estudio de supervivencia libre de enfermedad en función del resultado mediante Hematoxilina-Eosina del ganglio centinela .....	110
	IV.2. Estudio de supervivencia libre de enfermedad en función del resultado mediante RT-PCR del ganglio centinela .....	112
<b>DISCUSIÓN</b>	.....	114
<b>CONCLUSIONES</b>	.....	138
<b>ANEXOS</b>		
I.	Anexo 1. Consentimiento informado para la biopsia selectiva del ganglio centinela en tumores de mama .....	139
II.	Anexo 2. Documento de consentimiento informado para donación de tejido .....	143
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	.....	145
<b>ABREVIATURAS</b>	.....	152

# ***INTRODUCCIÓN***

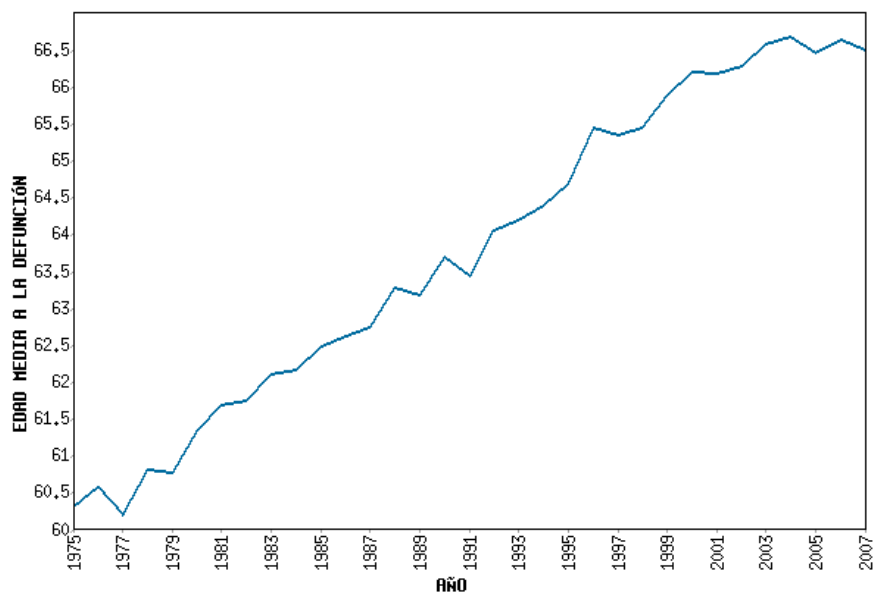
## **I. EPIDEMIOLOGÍA**

El cáncer de mama es la neoplasia diagnosticada con mayor frecuencia en las mujeres occidentales, estimándose que en los países de la Unión Europea (U.E.), la probabilidad de desarrollar un cáncer de mama antes de los 75 años es del 8%. Anualmente, en nuestro país, se diagnostican unos 16.000 casos al año, representando el 24,6% de todos los tumores de sexo femenino, y produce la muerte de casi 6.000 mujeres<sup>1</sup>. En España, la tasa de incidencia ajustada por edad en 1997 fue 69,98 por 100.000 habitantes<sup>2</sup>, la menor de la U.E., pero, al igual que en otros países occidentales, ha sufrido un considerable aumento, más marcado entre las décadas del 70 al 90.

Se calcula que el cáncer de mama afecta a lo largo de la vida a una de cada ocho mujeres en Estados Unidos (E.E.U.U.) y a una de cada 12-14 mujeres en España, por lo que constituye un problema sanitario y social de primer orden en el mundo occidental. La tasa de incidencia de dicho tumor se ve incrementado debido, fundamentalmente, al envejecimiento poblacional y al diagnóstico cada vez más precoz de esta enfermedad. Existe una relativa constancia de la mortalidad, a pesar del aumento de la incidencia, posiblemente a causa de la mejora en los programas de detección precoz y en el manejo terapéutico de las pacientes. En el año 2007 se produjeron 5.971 defunciones en mujeres por cáncer de mama en España (Figura 1). Los casos mayoritarios de dicho cáncer se diagnostican entre los 35 y 80 años de edad, siendo su pico de incidencia máximo entre los 45 y 65 años (Figura 2).

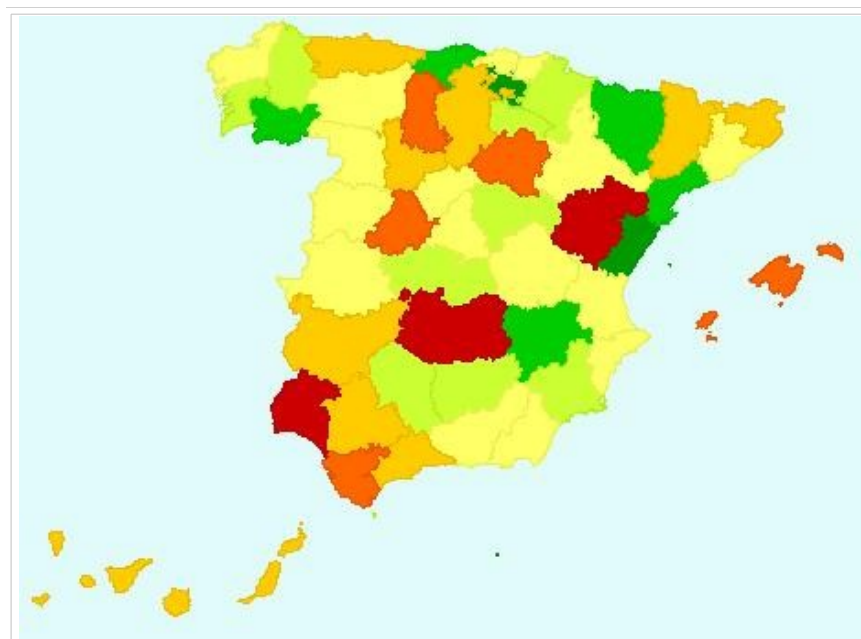
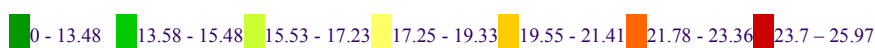


**Figura 1.** Número de defunciones del cáncer de mama, en sexo femenino, en España entre los años 1975-2007. Centro Nacional de Epidemiología Instituto de Salud Carlos III.



**Figura 2.** Edad media de defunción por cáncer de mama en España. Año 1975-2007. Centro Nacional de Epidemiología Instituto de Salud Carlos III.

La supervivencia global a los cinco años de edad de las pacientes afectas de cáncer de mama es de un 78%, mejorando de manera importante en la última década. El carcinoma 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 3 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.



**Figura 3.** 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.

## **II. FACTORES DE RIESGO**

La etiología del cáncer de mama es objeto de gran variedad de estudios, pero todavía en nuestros días se desconoce cuál es la causa última del mismo. Por el contrario, se han descrito multitud de factores de riesgo asociados a dicho tumor. El factor genético posee gran importancia, las mujeres con mutaciones en el gen “cáncer de mama 1” (breast cancer 1, BRCA-1), gen supresor tumoral que regula el ciclo celular y evita la proliferación celular, tienen un 60% de riesgo de padecer un cáncer de mama a lo largo de su vida. El factor de riesgo más importante es la edad, puesto que el riesgo de cáncer de mama se incrementa rápidamente durante los años fértiles de la mujer, mientras que tras la menopausia sigue habiendo un crecimiento pero enlentecido. A pesar de todo esto sólo un 30% de todos los cánceres de mama pueden ser atribuidos a factores de riesgo conocidos. Por otro lado, sería de gran importancia poder determinar el riesgo que una determinada paciente posee para adecuar el control mamario y el manejo terapéutico de la misma.

Los factores de riesgo de cáncer de mama que se han descrito hasta el momento pueden clasificarse en: factores genéticos, hormonales, ambientales y lesiones precursoras mamarias<sup>3</sup>.

### **1. FACTORES GENÉTICOS**

Los antecedentes familiares de cáncer de mama elevan de manera importante el riesgo de padecer dicho tumor. Poseer un familiar de primer grado con cáncer de mama origina que el paciente posea un riesgo relativo de 2,3 de padecer la enfermedad, mientras que

si dicho tumor es bilateral el riesgo relativo se incrementa a 10,5. No obstante, la mayoría de los casos son esporádicos y sólo en un 5-10% se pueden asociar a un gen de herencia autosómica dominante con penetrancia incompleta.

Los genes supresores tumorales más relacionados con esta enfermedad son el BRCA-1, asociado con el 50% de los cánceres de mama hereditarios, y el “cáncer de mama 2” (breast cancer 2, BRCA-2), relacionado con el 40% de dichos tumores genéticamente dependientes. El 10% restante se relaciona con otros genes tales como p53, ATM, PTEN/MMAC, MSH2, STK11. En los últimos años se ha incorporado un nuevo gen HMMR, que predispone a esta patología.

## 2. FACTORES HORMONALES

Las hormonas más relacionadas con el posible desarrollo del cáncer de mama son los estrógenos, debido, fundamentalmente, a su capacidad para activar la proliferación celular alterando el ciclo celular (estimulación de células G0, reducción de la fase G1 y disminución del tiempo total de dicho ciclo). Al producirse un incremento de la proliferación se puede aumentar la tasa acumulativa de errores genéticos, que se han originado al azar, desarrollándose un cuadro neoplásico.

Estos factores hormonales pueden ser, a su vez, de origen endógeno o exógeno.

- FACTORES HORMONALES ENDÓGENOS

La actividad ovárica prolongada, por consiguiente casos de menarquia temprana, menopausia tardía, nuliparidad o primer embarazo tardío a partir de los 30 años, se

asocian a un riesgo relativo de 1,12, al existir un incremento del tiempo de exposición a los estrógenos endógenos de la mujer en edad fértil.

También se implica en el aumento del riesgo de padecer cáncer de mama la lactancia materna durante un periodo de tiempo corto, así como el empleo de lactancia artificial.

- FACTORES HORMONALES EXÓGENOS

La administración exógena de hormonas (riesgo relativo 1,12) tanto por el empleo de tratamiento hormonal sustitutivo, durante la etapa perimenopáusicas, o anticonceptivos hormonales en la edad fértil, se ha visto relacionado con un incremento del riesgo en la oncología mamaria. Este tema ha sido objeto de múltiples estudios, llegándose a la conclusión que los resultados deben interpretarse con gran cautela, debido a la variación de dosis empleadas, vías de administración y duración de los tratamientos.

### 3. FACTORES AMBIENTALES

Los factores dietéticos que provocan un incremento de la adiposidad en la mujer, tales como el consumo de grasas y alcohol, provocan una elevación de la producción de estrógenos aumentando el riesgo de padecer un cáncer de mama.

La exposición a radiaciones ionizantes, aumenta de forma moderada, el riesgo de neoplasia mamaria, siendo mayor cuanto más temprana sea la edad de exposición. Por otro lado, existe evidencia que tanto las radiaciones no ionizantes como los campos electromagnéticos también producen un aumento de la probabilidad de desencadenar dicho cáncer, posiblemente debido a la alteración de la glándula pineal. Por

consiguiente se origina una modificación en la secreción de melatonina, hormona implicada en la regulación antitumoral.

Mujeres con nivel socioeconómico alto tienen mayor riesgo de padecer un cáncer de mama, pero la tasa de mortalidad es menor.

#### 4. LESIONES PRECURSORAS MAMARIAS

Los antecedentes personales de patología mamaria constituyen un riesgo para sufrir cáncer de mama, siendo la hiperplasia epitelial atípica la patología benigna mamaria que más se asocia con un mayor riesgo de desarrollo de dicho tumor. También se debe realizar un seguimiento exhaustivo a todas aquellas pacientes con hiperplasia lobulillar y ductal atípica y carcinoma lobulillar y ductal in situ, por considerarse todas ellas lesiones precancerosas.

También se ha descrito aumento de riesgo de patología oncológica mamaria en pacientes con antecedentes personales de cáncer de endometrio, de ovario y de colon.

### **III. PREVENCIÓN Y DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER DE MAMA**

Para la obtención de éxito frente a una enfermedad se precisa una prevención exhaustiva de la misma. La auténtica prevención del cáncer de mama es la detección precoz del mismo. En el momento actual sólo el tamoxifeno ha sido aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) norteamericana para la indicación de profilaxis en mujeres de alto riesgo de cáncer de mama, al haber demostrado en el estudio del grupo National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) su capacidad para reducir la incidencia de los cánceres hormonosensibles en estas mujeres, sin incrementar la supervivencia. Pero todavía hoy, existe gran número de preguntas sobre la relación riesgo-beneficio, la duración del tratamiento y otras series de aspectos del mismo. Como resultado de todo lo anterior, la quimioprofilaxis del cáncer de mama con tamoxifeno en el grupo de alto riesgo no se ha establecido de forma extensa todavía.

Existe otro estudio, el Estudio del Tamoxifeno y el Raloxifeno (STAR), que ha establecido la comparación entre la quimioprofilaxis con tamoxifeno y raloxifeno, habiéndose obtenido resultados similares en cuanto a la prevención del cáncer de mama (ambos fármacos redujeron el riesgo de padecer cáncer de mama en un 50%), siendo el tamaño muestral recogido de 19.747 mujeres posmenopáusicas con riesgo elevado de padecer cáncer de mama.

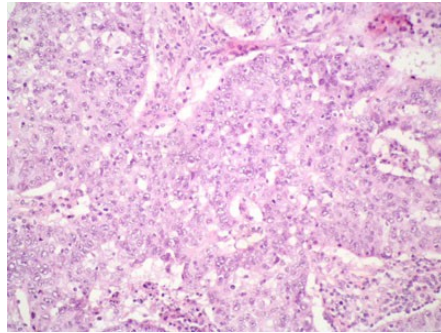
El diagnóstico de confirmación anatomopatológico es obligatorio en todos los casos de sospecha de cáncer de mama, puesto que aporta el diagnóstico de certeza del mismo. Siendo las diversas técnicas empleadas:

1. PUNCIÓN-ASPIRACIÓN CON CONTROL ECOGRÁFICO: se realiza en nódulos no palpables que sí se pueden identificar ecográficamente. Puede llevarse a cabo con aguja fina (punción-aspiración con aguja fina, P.A.A.F.), obteniendo citología, o con aguja gruesa (biopsia con aguja gruesa, B.A.G.), obteniendo un cilindro que permite el estudio histológico. La punción con aguja gruesa (trucut, biopsia core) obtiene material suficiente para la determinación de marcadores pronósticos, como receptores hormonales, c-erbB2, p53, etc...
2. PUNCIÓN-ASPIRACIÓN CON ESTEROTAXIA con aguja fina o gruesa: Se emplea en nódulos y distorsiones que no se definen adecuadamente con ecografía y sí con mamografía. Puede realizarse la extirpación completa de las microcalcificaciones con múltiples B.A.G. o con mamotomo.
3. BIOPSIA QUIRÚRGICA: Existen dos posibles tipos de biopsias en esta modalidad:
  - a. BIOPSIA INCISIONAL: Resección de una porción de la masa a filiar, realizándose de manera ambulatoria.
  - b. BIOPSIA EXCISIONAL: Resección del nódulo en su totalidad. A su vez se puede dividir en:
    - i. CIEGA: Se emplea en tumores palpables menores de 3-4 cm.
    - ii. CON ARPÓN: En tumores no palpables pero visibles por técnicas de imagen, bien mamografía o ecografía. Esta biopsia puede ser:

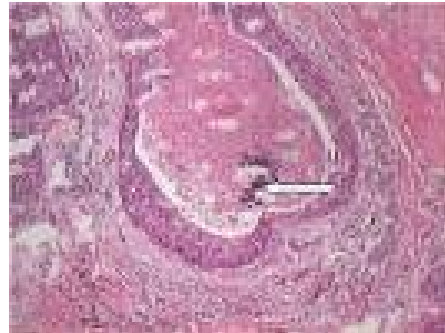
1. INTRAOPERATORIA: Permitiendo el diagnóstico y el tratamiento en una única intervención.
2. DIFERIDA: Permitiendo un estudio anatomopatológico completo y definitivo, al igual que un estudio de los márgenes y una mayor discusión sobre el tratamiento definitivo a realizar, con mayor participación por parte de la paciente.

Gracias al resultado anatomopatológico aportado por las pruebas anteriores los cánceres de mama se pueden dividir en función de su capacidad de invasión en:

1. INVASIVOS: La gran mayoría de dichos cánceres son epiteliales, clasificándose por orden de frecuencia en: tipo *ductal*, el más frecuente, y *lobulillar*, seguidos por los de tipo coloide, papilar y medular. Figura 4.
2. CARCINOMAS NO INVASIVOS (IN SITU): Se consideran una forma precoz de cánceres invasivos, por lo que deben ser tratados por extirpación correctamente. En los últimos años se ha incrementado la frecuencia de los mismos, sobretodo del *carcinoma intraductal* (Figura 5). El *carcinoma lobulillar in situ* no se considera en la actualidad un auténtico cáncer, sino una lesión de riesgo para desencadenar un cáncer invasivo en cualquiera de las dos mamas.



**Figura 4.** Carcinoma invasivo.



**Figura 5.** Carcinoma in situ.

El crecimiento del carcinoma mamario a nivel de la unidad túbulo-lobulillar de la mama es por división celular, sobrepasando la membrana basal, convirtiéndose así en un carcinoma infiltrante, alcanzado el estado de enfermedad sistémica. La extensión del tumor en la mama es por crecimiento directo, mientras que su diseminación a estructuras vecinas puede ser vía hematógena o linfática (principal vía de diseminación). La distribución de la metástasis tumoral mamaria, en función de la localización, es:

#### 1. METÁSTASIS SISTÉMICAS

El pulmón es el órgano donde con mayor frecuencia se producen las metástasis del cáncer de mama. La presentación en dicha localización puede ser a modo de nódulo solitario, nódulos múltiples o linfangitis carcinomatosa.

Otra localización de la extensión del cáncer de mama es a nivel abdominal, localizadas fundamentalmente en los siguientes órganos: hígado, peritoneo y ovario.

Existe un patrón distinto de metástasis a distancia en el caso del carcinoma lobulillar infiltrante, siendo más frecuente que en el ductal la afectación secundaria peritoneal y

retroperitoneal, de la pared del tubo digestivo y de los órganos genitales. Estas metástasis se pueden producir muchos años después del tumor primario.

El cáncer de mama es la principal causa de metástasis óseas, afectando principalmente a pelvis, columna vertebral, fémur, costillas, cráneo, húmero, escápula y clavícula. Las lesiones pueden ser osteolíticas, osteoblásticas, mixtas o intertrabeculares.

Las metástasis en encéfalo tienen como principal origen el cáncer de mama. El carcinoma lobulillar, tiene como peculiaridad, una especial afectación de la leptomeníngea.

Por último, el cáncer de mama también es el que, con mayor frecuencia, provoca enfermedad metastásica en el ojo, pudiendo ser incluso bilateral.

## 2. DISEMINACIÓN LINFÁTICA

Se considera que el tamaño del tumor primario está directamente relacionado con el número de metástasis axilares. El 75% del drenaje linfático de la mama se realiza hacia los ganglios axilares homolaterales, ya que la mayoría de los tumores se localizan en los cuadrantes externos. La invasión de los mismos se considera el factor pronóstico más importante en el cáncer de mama. Si el tumor se localiza en cuadrantes internos, la vía de diseminación es hacia los ganglios mamarios internos. La afectación ganglionar se realiza de manera ordenada siguiendo los niveles de Berg, pero en un 2-3% puede saltarse algún nivel. Los niveles de Berg se clasifican en:

- NIVEL I: ganglios localizados por debajo del borde inferior del músculo pectoral menor.
- NIVEL II: ganglios linfáticos detrás del músculo pectoral menor.
- NIVEL III: es el grupo subclavicular, formado por tres o cuatro ganglios en el ápex de la axila.

Debido a la consideración del cáncer de mama como enfermedad sistémica es preciso establecer un correcto diagnóstico de extensión. Los resultados de dicho estudio se definen por el sistema TNM. La extensión locorregional en pacientes con tumores operables se hace gracias a la cirugía (tumorectomía o mastectomía seguidas de linfadenectomía axilar o biopsia selectiva del ganglio centinela). La técnica de la biopsia selectiva de ganglio centinela se emplea en pacientes con carcinoma de mama estadio I-II (T1 o T2) con axila clínicamente negativa.

En pacientes con tumores localmente avanzados o con más de cuatro ganglios axilares positivos, donde la incidencia de metástasis en las pruebas de extensión es más alta, se aconseja realizar una tomografía axial computerizada (T.C.) de cuerpo completo y una gammagrafía ósea.

La tomografía por emisión de positrones (P.E.T.) es una técnica que permite determinar las características de lesiones de malignidad indeterminada, estadificar el tumor, indicar el pronóstico, valorar la respuesta al tratamiento y diagnosticar recurrencias. Pero todavía no se emplea como técnica estándar en la estadificación del cáncer de mama.

#### **IV. FACTORES PRONÓSTICO**

Los factores pronóstico del cáncer de mama son aquellos factores clínicos, histológicos o moleculares que predicen la evolución de las pacientes, recaída y supervivencia.

Dichos parámetros se pueden estratificar en distintos grupos, como son:

- Factores morfológicos: tamaño tumoral (relacionado con el riesgo de recaída, generalmente en pacientes con tumores N0), metástasis ganglionares, ganglio centinela, grado histológico, tipo histológico o índice mitótico. El factor pronóstico de mayor importancia en el cáncer de mama es la presencia de metástasis linfáticas.
- Parámetros biológicos: estado de receptores hormonales y alteración del oncogén c-erb B2/Her2-neu.
- Alteraciones genéticas del gen supresor p53, que puede asociarse a alto grado histológico y mayor agresividad clínica. También la determinación del antígeno de proliferación celular de la proteína nuclear Ki67.
- No se consideran factores pronósticos en el momento actual, aunque se encuentran en fase de estudio, el análisis aislado de ploidía de ADN y la neoangiogénesis.

En pacientes con metástasis se consideran factores de supervivencia el performance status, el tipo y el número de órganos afectos, el tratamiento quimioterápico previo con antraciclinas, la presencia o no de receptores hormonales y el intervalo libre de enfermedad.

## **V. MEDIDAS TERAPÉUTICAS DE LA NEOPLASIA MAMARIA**

El tratamiento del cáncer de mama se puede realizar desde diferentes vías de abordaje. A lo largo de los años, el tratamiento del cáncer de mama ha sufrido grandes cambios, debido fundamentalmente a que las cirugías mutilantes han dado paso a tratamientos menos agresivos. Las estrategias de diagnóstico precoz han contribuido a que este tumor se diagnostique en estadios más iniciales, siendo el tratamiento conservador de la mama de elección en un porcentaje muy alto de casos.

La introducción de la técnica de biopsia selectiva de ganglio centinela en la práctica clínica permite realizar tratamiento conservador de la axila, evitando a un gran número de pacientes las secuelas derivadas de una linfadenectomía axilar.

También se están produciendo cambios en cuanto a tratamientos sistémicos, nuevos fármacos, anticuerpos monoclonales como tratamientos diana, técnicas de microchips y biología molecular para poder diseñar tratamientos a medida.

En cuanto a la radioterapia también se están introduciendo nuevas técnicas: la radioterapia intraoperatoria permite reducir el tiempo de exposición, de uno a cinco días, con la ventaja que esto supone para las pacientes, con el mismo resultado clínico y con menos efectos secundarios.

El tratamiento del cáncer de mama estará basado fundamentalmente en la estadificación de la enfermedad (Tabla 1).

**Tabla 1.** Estadificación del cáncer de mama.

<b>AGRUPACIÓN POR ESTADIOS</b>			
<b>ESTADIO 0</b>	Tis	N0	M0
<b>ESTADIO I</b>	T1	N0	M0
<b>ESTADIO IIA</b>	T0-1	N1	M0
	T2	N0	M0
<b>ESTADIO IIB</b>	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
<b>ESTADIO IIIA</b>	T0-2	N2	M0
	T3	N1-2	M0
<b>ESTADIO IIIB</b>	T4	N0-2	M0
<b>ESTADIO IIIC</b>	Cualquier T	N3	M0
<b>ESTADIO IV</b>	Cualquier T	Cualquier N	M1

El manejo terapéutico del cáncer de mama es de gran complejidad e implica la realización de diferentes pasos para completar el mismo. Los tratamientos del carcinoma de mama son: tratamiento quirúrgico, tratamiento radioterápico y tratamiento médico.

1. **TRATAMIENTO QUIRÚRGICO:** Dicho tratamiento se va a realizar en función del tipo de carcinoma que padezca la paciente:
  - Carcinoma intraductal: Tumorectomía sin disección axilar. Si existe alto riesgo se realizará mastectomía pero sin linfadenectomía.

- Carcinoma invasor menor de 3 centímetros (cm): Cirugía conservadora asociado a biopsia de ganglio centinela si no existe clínica axilar. Si la anatomía del ganglio centinela resulta de malignidad se realizará linfadenectomía axilar, al igual que si existe clínica.
- Carcinoma invasor mayor de 3 cm.: se puede realizar mastectomía o bien quimioterapia neoadyuvante seguida de cirugía.
- Carcinomas localmente avanzados: el tratamiento de elección es quimioterapia neoadyuvante seguido de cirugía y radioterapia.

2. TRATAMIENTO RADIOTERÁPICO. Las indicaciones de radioterapia son las siguientes:

- Tras cirugía conservadora en un carcinoma intraductal o carcinoma invasivo.
- Tras mastectomía en tumores mayores de 5 cm o con infiltración cutánea o muscular.
- Afectación de cuatro o más ganglios linfáticos axilares.
- Afectación de uno a tres ganglios linfáticos axilares con extensión extracapsular.

3. TRATAMIENTO MÉDICO. Se puede aplicar antes de la cirugía (neoadyuvancia) en tumores grandes, de crecimiento rápido y localmente avanzado, o bien tras la cirugía (adyuvancia). El tratamiento médico incluye: la hormonoterapia, la quimioterapia y el empleo de agentes biológicos.

- A. HORMONOTERAPIA: La hormonoterapia se suele utilizar en pacientes de buen pronóstico con receptores hormonales positivos. Entre ellos se encuentran los antiestrógenos (tamoxifeno), progestágenos (acetato de medroxiprogesterona), análogos de la hormona liberadora de gonadotropina (LHRH) e inhibidores de aromatasa (anastrozol, letrozol, exemestano). El tamoxifeno se debe emplear al menos durante dos años y, al pertenecer al grupo de los moduladores selectivos de receptores de estrógeno, precisa de la realización de controles ecográficos periódicos del grosor endometrial, al igual que estudios histológicos ante la presencia de metrorragia. Este fármaco disminuye el riesgo de patología cardiovascular y de cáncer de mama contralateral.
- B. QUIMIOTERAPIA: Se emplea en aquellas pacientes con pronóstico intermedio o pobre, asociada o no a hormonoterapia. Los fármacos citotóxicos más activos son: taxotere, adriamicina, taxol, epirubicina, navelbina, capecitabina, mitomicina C, 5-fluorouracilo, ciclofosfamida, mitoxantrone y metotrexato. Estos citotóxicos se suelen usar en combinación de dos o tres.
- C. AGENTE BIOLÓGICO: El trastuzumab es el agente biológico más empleado en el tratamiento del cáncer de mama. Es un anticuerpo monoclonal dirigido contra los receptores de Her2-neu. Se emplea en pacientes con tumores metastáticos que sobreexpresan dicho oncogén. Durante el año 2010 se han publicado estudios en fase II de la asociación del pertuzumab, otro anticuerpo monoclonal, con el trastuzumab mejorando los resultados terapéuticos<sup>4</sup>.

## **VI. TÉCNICA DE BIOPSIA SELECTIVA DE GANGLIO CENTINELA**

El ganglio centinela es el primer ganglio de la axila al que drena el tejido mamario, por tanto la extirpación y posterior estudio del mismo, permite conocer el estado de afectación del resto del territorio linfático axilar. La biopsia del ganglio centinela es una técnica mínimamente invasiva que permite el conocimiento de la ruta de distribución linfática de las células tumorales de un cáncer de mama.

Tiene gran importancia el conocimiento de la anatomía del sistema linfático, para el mapeo linfático, localización y extirpación del ganglio centinela. La función de dicho sistema es el drenaje de fluidos y proteínas localizados a nivel del espacio intersticial a los ganglios linfáticos. El inicio del sistema linfático es un conjunto de capilares ciegos, también llamados los prelinfáticos, capilares linfáticos o linfáticos terminales. Dichos capilares drenan, a su vez, en los vasos linfáticos colectores, que terminan desembocando a nivel de los troncos linfáticos aferentes. Uno o varios de dichos troncos aferentes drenan en los ganglios linfáticos, siendo recogida la linfa de dichos ganglios por los vasos o conductos linfáticos eferentes, que drenan en los troncos linfáticos centrales, terminando en los vasos sanguíneos a nivel cervical. Las paredes de los linfáticos iniciales están formadas por una capa simple de células endoteliales con membrana basal discontinua. Dicha separación permite el paso de moléculas proteicas. La pinocitosis también es un mecanismo para el transporte de partículas mayores de 30 nanómetros. La permeabilidad de los vasos colectores se realiza por medio de filamentos que van desde la pared externa del vaso a las fibras de colágeno perivasculares. Los vasos colectores son semejantes a los iniciales, pero cuentan con

válvulas, capa muscular circular y longitudinal. Dichas capas musculares forman unidades contráctiles separadas por válvulas, cada unidad entre dos válvulas forman la unidad funcional con peristalsis funcional espontánea con 10 contracciones por minuto, el linfangión. Dicho peristaltismo permite la contractilidad sincronizada con apertura y cierre valvular impidiéndose el reflujo linfático. La presión extrínseca estimula la contractilidad lo que explica que un masaje posterior a la inyección del colorante y/o coloide permite una mayor migración, incrementándose el flujo hacia el ganglio centinela.

La glándula mamaria y la piel suprayacente tienen el mismo origen embriológico, el ectodermo, por lo que el drenaje linfático es compartido. Los linfáticos parenquimatosos drenan en el plexo subareolar de Sappey y, en segundo lugar, en la axila. Por otra parte, existe un drenaje interno parenquimatoso que desemboca a nivel de la cadena mamaria interna, a través de los músculos pectorales e intercostales. El territorio mamario también puede drenar, pero en menor medida, a nivel retroesternal, supraclavicular, interpectoral, intramamario y paramamario. En caso de obstrucción del drenaje linfático principal puede existir flujo hacia axila contralateral o hígado. Por último, hasta el 30% de las pacientes con tumores localizados a nivel de cuadrantes externos pueden tener drenaje fuera de la axila.

La historia del ganglio centinela es extensa, describiéndose por primera vez dicho término en 1960 por Gould, basándose en la posición anatómica de un ganglio localizado tras la disección radical de cuello en una parotidectomía. La primera referencia sobre territorio linfático mamario fue en 1970 por Kett, tras la administración

de contraste en linfáticos mamarios, observando un flujo con dirección a los ganglios localizados alrededor de la vena axilar. La primera descripción fisiológica del ganglio centinela fue llevada a cabo por Cabanas en 1977, en el campo del carcinoma de pene, estableciéndose que dicho ganglio no sólo es el primer centro linfático de drenaje, sino que también puede llegar a ser el único ganglio afecto. Posteriormente se extendió dicho término a los melanomas cutáneos estadio I, Morton<sup>5</sup>.

La primera vez que se estableció la posibilidad de correlación entre el estado de un ganglio linfático regional primario y el estado de los ganglios axilares fue en un estudio realizado por Osborne<sup>5</sup> y colaboradores. Siendo en 1993, Krag y cols.<sup>5</sup>, quienes emplearon la sonda gamma para la radiolocalización del ganglio centinela, utilizando posteriormente dicha técnica para el estadificación del cáncer de mama.

El ganglio centinela (“sentinel node”) etimológicamente significa una adenopatía supraclavicular que constituye de forma frecuente el primer signo de una neoplasia abdominal maligna, generalmente un adenocarcinoma gástrico. Pero, a lo largo de la historia, el término de ganglio centinela ha pasado a definirse como la primera estación linfática ganglionar con células metastásicas de un tumor primario, siendo la localización muy variable (supraclavicular, axilar, inguinal...), en función de la localización del cáncer.

La presencia de metástasis en los ganglios linfáticos axilares es el indicador pronóstico más importante en el cáncer de mama<sup>6,7,8</sup>. La identificación de metástasis en los ganglios linfáticos y el número de ganglios linfáticos positivos identificados se emplean en la

estadificación, con el objetivo último de orientar el tratamiento de las pacientes. En las pacientes con cáncer de mama se ha confirmado la relación del estado del ganglio centinela con la presencia de metástasis en el territorio linfático axilar<sup>9,10,11,12,13,14</sup>.

Diversos trabajos han demostrado que el estudio del ganglio centinela tiene una sensibilidad que varía entre 83,4 - 100% para la detección de metástasis ganglionares a nivel axilar con el empleo de la histología de muestras incluidas en parafina y teñidas con hematoxilina y eosina<sup>15</sup>. El resultado del ganglio centinela negativo permite evitar la gran morbilidad asociada a la linfadenectomía axilar (dolor, incremento en la estancia hospitalaria y linfedema tanto agudo como crónico, con restricción de los movimientos alrededor del hombro)<sup>16,17</sup>. Otra gran ventaja de la biopsia del ganglio centinela es la realización de 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).

La Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria (S.E.S.P.M.)<sup>18</sup> define el ganglio centinela, en función de las diferentes técnicas empleadas para el diagnóstico del mismo en el acto quirúrgico. Por consiguiente, se determina como ganglio centinela:

- Desde el punto de vista de la gammagrafía, a aquel o aquellos que presentan migración desde el tumor mamario mediante un canal linfático o, ante la no evidencia de dicho canal, aquellos que aparecen en uno o varios territorios de

drenaje linfático. Por otro lado, se consideran ganglios centinelas secundarios a aquellos que presentan una captación del trazador con menor intensidad de manera diferenciada.

- En segundo lugar, la S.E.S.P.M. considera como ganglio centinela si se emplea el trazador isotópico, en el acto quirúrgico, aquel que presenta una actividad representativa y que está ubicado en el área preseleccionada gammagráficamente. Considerándose secundario aquel que tenga menos del 10% del de máxima actividad.
- Si en la técnica se emplea el colorante, y no el trazador isotópico, se define como ganglio centinela todo aquel que aparezca teñido de azul o al que fluye un conducto linfático azulado.

La correcta selección de las pacientes en las Consultas de Patología Mamaria es de gran importancia, siendo criterios de inclusión:

- a. Carcinomas invasivos de menos de 3 cm. Se ha demostrado una alta relación entre el tamaño tumoral y el riesgo de micrometástasis a nivel axilar<sup>19</sup>.
- b. Axila clínicamente negativa.
- c. Carcinoma intraductal con microinvasión.

Los criterios de exclusión para la realización de la biopsia selectiva del ganglio centinela son<sup>18,20</sup>:

1. La presencia de un estadio tumoral T4.

2. El diagnóstico de un carcinoma inflamatorio, puesto que existe obstrucción linfática tumoral.
3. La presencia preoperatoria de afectación ganglionar mediante pruebas de imagen (ecografía) y, al menos, citología, mediante punción aspiración con aguja fina, compatible con metástasis de carcinoma de las adenopatías sospechosas.
4. La existencia de linfadenectomía axilar previa, puesto que se predispone que no existiría tejido axilar que permitiese la migración, pero la evidencia ha demostrado que sí existe tejido y que la migración, en estos casos, es satisfactoria. Por consiguiente, podría plantearse la punción y ulterior realización del ganglio centinela si existe dicha migración.
5. Antecedente de radioterapia mamaria y/o axilar previa.

Existen contraindicaciones relativas como son: tumor multicéntrico, cirugía previa, prótesis mamaria, radioterapia previa y quimioterapia previa. Según el documento de consenso de expertos, publicado en la revista *Cancer* en Marzo de 2010, la gestación no es una contraindicación para el mapeo axilar con un radiotrazador, puesto que la dosis de radioactividad es muy baja <sup>21</sup>.

Por otro lado es precisa la colaboración de los Servicios de Medicina Nuclear, Anatomía Patológica y Biología Molecular, para la realización de la inyección y estudio del ganglio centinela, el análisis intraoperatorio del mismo y el posterior estudio inmunohistoquímico o mediante PCR de la muestra, respectivamente. Para el mapeo y la biopsia del ganglio centinela se precisa o bien azul de metileno o bien un

radiotrazador, pero en algunos estudios se afirma que para una correcta identificación del mismo es necesario el empleo conjunto de las dos técnicas, consiguiéndose así una mayor eficacia en la identificación<sup>22</sup>.

Langer y cols.<sup>23</sup> realizaron un estudio con el fin de valorar el riesgo de recurrencia axilar en todas aquellas pacientes con biopsia de ganglio centinela negativo para malignidad o bien con diagnóstico de micrometástasis (tamaño mayor a 0,2 mm pero menor a 2 mm), llegando a la conclusión que no existía mayor riesgo de dicha recurrencia en estas pacientes en comparación con aquellas mujeres sometidas a linfadenectomía axilar<sup>23,24</sup>. Por otro lado Rampaul y cols.<sup>25</sup> afirman que el significado pronóstico de las micrometástasis no se ha determinado en la actualidad y confirman la necesidad de un mayor número de estudios prospectivos para la determinación de los efectos sobre la supervivencia de dichas metástasis. La detección de micrometástasis en los ganglios linfáticos axilares se ha descrito en un rango entre 9 a 46%<sup>25</sup>.

La tasa de falsos negativos de la técnica de ganglio centinela (definida como la frecuencia con que un ganglio centinela es negativo para malignidad teniendo el resto de la axila cáncer), según numerosos estudios, varía entre 0 y 11%<sup>25</sup>. Este valor, durante el estudio previo de validación de dicha biopsia en el Hospital Clínico San Carlos (H.C.S.C.), resultó ser del 0,2%<sup>26</sup>.

American Joint Committee on Cancer (A.J.C.C.)<sup>27</sup> 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 principales cambios 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<sup>27</sup>.

## VII. INMUNOHISTOQUÍMICA EN EL CARCINOMA MAMARIO

El estudio anatomopatológico ha presentado una gran evolución a lo largo del tiempo. La determinación de la histología con la técnica de hematoxilina-eosina tiene varias limitaciones, siendo una de ellas la distribución irregular de las metástasis en el ganglio linfático<sup>28</sup>. La norma para la evaluación anatomopatológica consiste en examinar uno o más cortes teñidos con hematoxilina-eosina de cada ganglio linfático<sup>29</sup>. Los resultados erróneos de ganglios negativos con esta tinción pueden ser debidos a la extracción limitada de muestras de tejido ganglionar. Mediante la evaluación de niveles más profundos de los ganglios linfáticos de los cortes teñidos con hematoxilina-eosina o mediante el empleo de la tinción inmunohistoquímica se detectaron en diversos estudios metástasis que en un principio no habían sido diagnosticadas<sup>15,29,30,31</sup>. Por otro lado, las tinciones de hematoxilina-eosina puede que no detecten metástasis lobulillares en los ganglios centinelas que sí se podrían diagnosticar gracias a métodos de inmunohistoquímica. Las técnicas de inmunohistoquímica evidencian antígenos producidos por las células tumorales mediante reacciones tintoriales. Las determinaciones inmunohistoquímicas más destacadas dentro de la patología tumoral mamaria son:

### A. MARCADORES GENÓMICOS.

- i. Oncogén HER2-neu, también denominado c-erbB-2, ERBB2. Protooncogén que codifica una proteína similar al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).

- ii. Gen supresor p53. Localizado en el cromosoma 17, relacionado con la duplicación celular y la apoptosis.
- iii. Ciclina D1. Su función es la proliferación y normal diferenciación de la mama gestante.
- iv. Oncogén RAS o proteína p21. Relacionado con la transducción de estímulos proliferativos.
- v. Oncogén c-myc.
- vi. Oncogén int-2.
- vii. Oncogenes apoptóticos, entre los que cabe destacar el Bcl-2.

**B. OTROS MARCADORES.**

- i. Receptores hormonales de estrógenos y progesterona.
- ii. Catepsina-D (CAT-D). Relacionada con la capacidad invasiva del tumor, es una aspartil proteasa lisosómica de síntesis estrógeno-dependiente.
- iii. Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).
- iv. Proteína implicada en la respuesta hormonal, pS2.
- v. Proteínas del shock calórico (HSP 27 y HSP70).
- vi. Cadherina-E. Relacionada con la adhesividad intercelular.
- vii. Otros marcadores estudiados: 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 la respuesta al tratamiento con citostáticos).

Las técnicas de análisis en el carcinoma mamario pueden ser: morfométricas, fotodensitométricas, citometría de flujo y citodensitometría estática.

El uso prospectivo de la inmunohistoquímica y los cortes seriados para el diagnóstico histológico del ganglio centinela incrementan la detección de micrometástasis y de células tumorales aisladas, según Rydén y cols.<sup>32</sup>

## **VIII. TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CON TRANSCRIPCIÓN INVERSA (RT-PCR) EN EL GANGLIO CENTINELA**

La RT-PCR es una técnica que permite, como se ha dicho anteriormente, ver la presencia de metástasis de células tumorales de mama en los ganglios linfáticos mediante la detección de marcadores de expresión de genes presentes en el tejido mamario (RNA mensajero, específico del tipo de células). Como es conocido, las metástasis linfáticas son el factor pronóstico más importante en esta patología, pero hay pacientes en estadio I (T1N0M0) que fallecen de la propia enfermedad. Por consiguiente, la mejor identificación de las micrometástasis en los ganglios linfáticos axilares puede llevar hacia un manejo más correcto de la enfermedad, mejorando el pronóstico de la paciente. Para eso se precisa el estudio de diferentes marcadores de carcinoma mamario hasta llegar a la determinación del marcador ideal. El marcador ideal de la mama, es decir, aquel presente en todas las células tumorales y siempre ausente en los ganglios axilares no afectados o normales, no ha sido identificado en la actualidad.

Las primeras secuencias que fueron descritas para su empleo en la PCR fueron: CK19, MUC-1, maspin, VEGF, TGF- $\beta$ , CEA y mamoglobina.

- Citoqueratina 19 (CK19). Es uno de los marcadores más frecuentemente citados en la literatura dentro del cáncer de mama, predictor de la presencia de micrometástasis en ganglios axilares. La determinación de esta citoqueratina está

siendo estudiada no sólo en la predicción de micrometástasis en el cáncer de mama sino también en los estadios precoces de cáncer de cérvix<sup>33,34</sup>.

- Mucina implicada en la adhesión intercelular (MUC-1). Se ha descrito en diversos estudios su sobreexpresión en el cáncer de mama y su ausencia en los ganglios linfáticos normales.
  
- Maspin. Inhibidor de la proteasa sérica mamaria, se ha objetivado en algunos estudios como un atractivo marcador, debido a su presencia en el cáncer de mama primario y metastático, mientras que era ausente en sangre periférica de pacientes sanos.
  
- Factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), se puede encontrar elevado en numerosas neoplasias.
  
- Factor de crecimiento tumoral (TGF- $\beta$ ). Citoqueratina implicada en la regulación de la proliferación del crecimiento tumoral.
  
- Antígeno carcinoembrionario (CEA). Marcador de gran importancia implicado en el cáncer gástrico y colorrectal, al igual que en algunos casos de carcinoma mamario. Existen estudios que determinan CEA mediante RT-PCR en nódulos linfáticos y sangre periférica.

- Mamoglobina. La mamoglobina humana (h-MAM) fue identificada en 1996 por Watson y Fleming<sup>35</sup>. Es un marcador expresado únicamente en tejido mamario adulto y en el 80-95% de los tumores de mama primarios. La expresión de la mamoglobina se ha observado en las células epiteliales de la mama, pero no en células mioepiteliales ni del estroma mamario. La sensibilidad y especificidad de la mamoglobina según diversos autores es de 88% y 72% respectivamente<sup>36</sup>. La forma biológicamente activa de la mamoglobina parece ser un complejo de la misma y otro miembro de la familia, BU101, también conocida como lipofilina B<sup>37,38</sup>. En el estudio realizado por Núñez-Villar y colaboradores<sup>37</sup> se determinó que la expresión de la mamoglobina se asocia a un fenotipo tumoral de menor agresividad. Otra vía de estudio fue la realizada por Roncella y cols.<sup>39</sup> donde se describió la ausencia de h-MAM en aquellos tumores de mama pobremente diferenciados desde el punto de vista histológico. Todos los trabajos anteriormente citados confirman que la h-MAM es un marcador de gran especificidad para el estudio del pronóstico del cáncer de mama primario, metástasis o micrometástasis<sup>35,36,37,38,39,40,41</sup>. Por otro lado, diversos estudios preconizan que debido a la gran heterogeneidad del carcinoma mamario se precisa la determinación por RT-PCR de otros genes complementarios a la mamoglobina. Zehentner y cols.<sup>42</sup> han estudiado tres genes con este fin, estos son: B305D, subunidad  $\pi$  del receptor tipo A de la  $\gamma$ -aminobutirato (GABA $\pi$ ) y B726P. La conclusión a la que se llega en este estudio es que el empleo de múltiples marcadores produce un incremento de la sensibilidad diagnóstica y pronóstico en el cáncer de mama.

Algunos estudios preconizan que los marcadores “ideales” que deberían determinarse por RT-PCR debieran ser el CEA y la mamoglobina<sup>43</sup>.

Por otro lado, se han realizado estudios donde se ha demostrado que los marcadores glicoproteína epitelial 2 y citoqueratina 19 son insuficientes para aportar información que permita el manejo clínico adecuado de la paciente<sup>44</sup>. Existen marcadores anteriormente expuestos que se han detectado mediante la técnica de PCR en pacientes sanos como son CEA, CK-19 y MUC-1, por tanto no serían marcadores ideales del cáncer de mama<sup>45</sup>.

Masuda y colaboradores<sup>46</sup> realizaron un estudio donde se evidencia que la RT-PCR es una prueba complementaria al análisis histopatológico de gran poder y sensibilidad para la detección de micrometástasis en el ganglio centinela. Pero, aconsejan, que para el manejo y el tratamiento de pacientes con micrometástasis es necesario la asociación de la PCR con determinaciones como: la ploidía, la amplificación del c-erbB2, la expresión de la proteasa y la detección de células tumorales diseminadas en sangre periférica y médula ósea.

En la actualidad, se están llevando a cabo estudios sobre la determinación de la RT-PCR cuantitativa en otros tipos de cánceres, véase el cáncer de esófago<sup>47</sup>, para determinar si aporta una mayor sensibilidad y especificidad a la RT-PCR estándar para la predicción de recidiva tumoral en pacientes con ganglios negativos en dicho cáncer. En este estudio se concluye que la sensibilidad y especificidad para dicha detección es de un 90% y 90%, respectivamente. El desarrollo de protocolos de RT-PCR cuantitativa rápida

intraoperatoria en el cáncer de mama podría aportar una alta sensibilidad en el análisis del ganglio centinela en el mismo acto quirúrgico y así aportar una mayor información de si es necesaria o no la realización de linfadenectomía axilar para el control de la enfermedad <sup>42</sup>.

## **IX. CLASIFICACIÓN MOLECULAR DEL CÁNCER DE MAMA**

El desarrollo tecnológico de la expresión génica por “microarray” (matriz de DNA) ha originado un impacto de gran importancia en la comunidad científica. La capacidad de analizar la expresión de miles de genes es un experimento único que ha dado origen a un gran avance en las respuestas de múltiples cuestiones sobre el cáncer de mama. Los diferentes estudios revelaron cuatro subtipos moleculares de cáncer de mama<sup>48,49</sup>, estos son:

- Luminal: Grupo de cánceres de mama con elevada expresión de células luminales mamarias, asociado a una disminución del oncogén HER2-neu. También expresan citoqueratinas de bajo peso molecular (CK7, CK8, CK18...). Posteriormente se observó que este tipo de tumor podía dividirse en, al menos, dos grupos, cuyas características de evolución clínica eran significativamente diferentes<sup>50</sup>:
  - o Luminal A: Presenta, como características, elevados niveles de expresión de receptores de estrógeno y bajos niveles de genes relacionados con la proliferación celular. Generalmente poseen un grado histológico bajo y buen pronóstico.
  - o Luminal B: Normalmente se relacionan con alto índice de proliferación celular y elevado grado histológico, como consecuencia de todo ello, poseen un peor pronóstico que los cánceres de mama del subtipo luminal A.
- Basal o “triple negativo”: No expresa ni receptores hormonales ni el oncogén HER2-neu, sin embargo expresan queratinas de alto peso molecular (CK5/6,

CK14) y P63 de forma semejante al epitelio basal. Es el subtipo de peor pronóstico, careciendo de dianas terapéuticas específicas en el momento actual.

- HER2: Este grupo incluye pacientes con sobreexpresión del oncogén HER2-neu, y receptores de estrógeno negativos. Son neoplasias de mal pronóstico pero que pueden ser tratados con trastuzumab, respondiendo de manera satisfactoria al tratamiento quimioterápico neoadyuvante.
- “Normal-breast like” (semejante a la mama normal): Subtipo molecular que incluye tumores que sobreexpresan genes normales del tejido adiposo y otros tipos celulares no epiteliales.

## **OBJETIVOS**

Los objetivos de esta Tesis sobre el estudio biomolecular a tiempo real del ganglio centinela en todas aquellas pacientes afectas de carcinoma de mama son:

1. Determinar los parámetros de agudeza diagnóstica de la práctica a estudio, RT-PCR cuantitativa intraoperatoria.
2. Realizar la validación de la técnica RT-PCR a tiempo real, tras comparación analítica con la prueba de diagnóstico “gold standard”, estudio anatomopatológico definitivo.
3. Establecer el valor pronóstico de la RT-PCR cuantitativa (QRT-PCR) en los ganglios centinelas negativos de aquellas pacientes con cáncer de mama, realizando el estudio de supervivencia libre de enfermedad de las pacientes sometidas a un intervención de biopsia selectiva de ganglio centinela, siendo su estudio intraoperatorio mediante la RT-PCR cuantitativa y mediante estudio intraoperatorio de muestra congelada.

**PACIENTES**

## **I. PERIODO DE ESTUDIO**

Este trabajo ha sido realizado durante el periodo de tiempo comprendido entre 2006-2010 en el seno de un equipo multidisciplinario dedicado a la atención de pacientes diagnosticadas de carcinoma mamario, con la colaboración de los Servicios de Obstetricia y Ginecología (Sección de Patología Mamaria), Análisis Clínicos (Genómica), Medicina Nuclear y Anatomía Patológica del Hospital Clínico “San Carlos” de Madrid. Las pacientes fueron intervenidas quirúrgicamente durante el periodo 2006-2007.

## **II. POBLACIÓN DE ESTUDIO**

De un total de 240 pacientes sometidas a biopsia selectiva del ganglio centinela entre los años (2006 – 2007), se recoge una población, para la realización de este trabajo, de 99 pacientes consecutivos, pertenecientes al área del Hospital Clínico “San Carlos”, de Madrid. Este grupo de pacientes fue intervenido quirúrgicamente por carcinoma de mama y el diagnóstico fue confirmado por análisis histológico tanto de la pieza de resección de la mama como del ganglio centinela en el mismo acto quirúrgico, constituyendo 180 ganglios centinelas a estudio. Las pacientes fueron informadas de manera pormenorizada sobre el estudio y dieron su consentimiento por escrito previo a la cirugía (Anexo 1 y 2), según se expresa en el protocolo de dicho hospital. El seguimiento de la muestra es de 40 meses, constituyendo como eventos la recidiva independientemente de su localización y los episodios de éxitus.

## **II. 1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN DE LA POBLACIÓN**

Se realiza un estudio analítico prospectivo incluyendo como pacientes, todas aquellas que cumplen los siguientes criterios de inclusión:

- Pacientes con diagnóstico anatomopatológicos de carcinoma invasor de mama menor o igual a 3 cm., con seguimiento en el Hospital Clínico “San Carlos”.
- Pacientes de sexo femenino.
- Realización de técnica selectiva de biopsia de ganglio centinela, con resultado intraoperatorio “negativo” para malignidad.

## **II.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

Los criterios que excluyeron a las pacientes del estudio fueron:

- La presencia de un estadio tumoral T4.
- El diagnóstico de un carcinoma inflamatorio.
- La presencia preoperatoria de afectación ganglionar mediante pruebas de imagen (ecografía) y, al menos, citología, mediante punción aspiración con aguja fina, compatible con metástasis de carcinoma de las adenopatías sospechosas.
- La existencia de cirugía y/o radioterapia axilar previa.

La realización de un protocolo sobre la técnica de biopsia selectiva del ganglio centinela ha originado la aparición de controversias o contraindicaciones relativas establecidas por el grupo de expertos reunidos en el año 2009 por la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (S.E.G.O.)<sup>20</sup>. Los datos que conllevan una serie de dudas

sobre su inclusión o no en los criterios de la biopsia del ganglio centinela son los siguientes:

- Edad, debido fundamentalmente al deterioro de la circulación linfática en las pacientes de edad avanzada. Por el contrario, este parámetro no altera la fiabilidad de la técnica, por consiguiente si la migración del coloide es adecuada, sí se puede incluir pacientes de mayor edad en el estudio.
- El índice de masa corporal elevado, debido a la disminución de la migración en pacientes obesas.
- La presencia de un tumor multicéntrico, pero existe una evidencia limitada en estos casos.
- Durante la gestación no está contraindicado el empleo del radioisótopo<sup>21</sup>, mientras que no puede emplearse el colorante vital.
- Portadoras de prótesis mamarias, la mayoría de los grupos no contraindican el empleo de la biopsia del ganglio centinela en estas pacientes, porque no se ha demostrado disminución de la migración del coloide.
- En la actualidad no existe una contraindicación clara sobre pacientes que hayan presentado una cirugía mamaria previa. Sólo en casos con mastoplastias de reducción amplias que producen una alteración de la distribución del territorio linfático podría plantearse la duda de no realizar esta técnica.
- No existe evidencia para recomendar una nueva realización de ganglio centinela en aquellas pacientes sometidas a dicha técnica previamente y que presenten una nueva recidiva tumoral.

- Pacientes con mutación del gen BRCA, pero sanas. En estas pacientes candidatas para la realización de una mastectomía profiláctica, la realización de la biopsia selectiva del ganglio centinela no incrementaría la morbilidad y, por el contrario, sí beneficiaría a aquel porcentaje de pacientes con cáncer de mama oculto y posible afectación axilar.

En el estudio no se excluyeron aquellas pacientes con tumor multicéntrico, antecedentes de cirugía previa ni en portadoras de prótesis mamaria.

## ***MÉTODOS***

## **I. METODOLOGÍA CLÍNICA**

La gran importancia de la primera consulta, a la que acude la paciente con sospecha de cáncer de mama, radica en una correcta orientación para un diagnóstico más certero y un rápido tratamiento. Cuando la paciente acude a dicha visita a la Sección de Patología Mamaria, con sospecha de patología oncológica, el especialista procede a la confirmación del diagnóstico mediante la realización de una adecuada historia clínica, exploración mamaria y axilar con la solicitud de las pruebas complementarias precisas de imagen (ecografía mamaria y/o axilar, mamografía, resonancia magnética nuclear, tomografía axial computerizada, tomografía con emisión de positrones) y de estudio de la estirpe tumoral (punción-aspiración con aguja fina, biopsia con aguja gruesa).

La indicación de la realización de la técnica de la biopsia selectiva del ganglio centinela se establece en la consulta de Patología Mamaria del Hospital Clínico “San Carlos”, según los criterios de inclusión descritos previamente. Con el fin de realizar una correcta estratificación de las pacientes a estudio se realiza la clasificación TNM en función de la American Joint Committee on Cancer (A.J.C.C.)<sup>27,51</sup> siendo la sexta edición la descrita en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Clasificación TNM del cáncer de mama.

<b>CLASIFICACIÓN TNM</b>	
<b>T</b>	<b>TUMOR PRIMARIO</b>
<b>Tx</b>	El tumor primario no puede ser evaluado.
<b>T0</b>	No evidencia de tumor primario.
<b>Tis</b>	Carcinoma in situ.
Tis (DCIS)	Carcinoma ductal in situ.
Tis (LCIS)	Carcinoma lobulillar in situ.
Tis (Paget)	Enfermedad de Paget* del pezón sin carcinoma asociado.
<b>T1</b>	Tumor $\leq 2$ cm.
T1mic	Microinvasión $\leq 0,1$ cm de dimensión máxima.
T1a	Tumor 0,1-0,5 cm.
T1b	Tumor 0,5-1 cm.
T1c	Tumor 1-2 cm.
<b>T2</b>	Tumor $> 2$ pero $\leq 5$ cm.
<b>T3</b>	Tumor $> 5$ cm.
<b>T4</b>	Tumor de cualquier tamaño con extensión directa a pared torácica o piel.
T4a	Extensión a pared torácica (no incluye músculo pectoral).
T4b	Edema (incluye piel de naranja) o ulceración de piel de mama, o nódulos cutáneos satélites confinados a la misma mama.
T4c	T4a + T4b.
<b>T4d</b>	Carcinoma inflamatorio**.

**N           GANGLIOS LINFÁTICOS REGIONALES (Clínica)**

**Nx**           No puede evaluarse.

**N0**           No metástasis en ganglios regionales.

**N1**           Metástasis en ganglios axilares ipsilaterales móviles.

**N2**

N2a       Metástasis en ganglios axilares ipsilaterales fijos o adheridos entre sí o a otras estructuras.

N2b       Metástasis en ganglios de la mamaria interna ipsilateral clínicamente aparentes (en ausencia de metástasis axilares clínicamente evidentes).

**N3**

N3a       Metástasis en ganglios infraclaviculares ipsilaterales y ganglios axilares.

N3b       Metástasis en ganglios de la cadena mamaria interna ipsilateral y ganglios axilares.

N3c       Metástasis en ganglios supraclaviculares ipsilaterales con o sin simultánea afectación de ganglios axilares y/o de cadena mamaria interna.

**pN          GANGLIOS LINFÁTICOS REGIONALES (Patológicos)**

**pNx**        No pueden evaluarse (por ejemplo, previamente eliminado, o no se elimina para estudio patológico).

**pN0**        No metástasis ganglionares regionales histológicamente, sin examen adicional de las células tumorales aisladas (ATC) \*\*\*.

pN0 (i -) No metástasis ganglionares regionales histológicamente, IHC negativo.

pN0 (i +) No metástasis ganglionares regionales histológicamente, IHC positiva con ATC.

pN0 (mol -) No metástasis ganglionares regionales histológicamente, hallazgos moleculares negativos (RT- PCR).

pN0 (mol +) No metástasis ganglionares regionales histológicamente, hallazgos moleculares positivos (RT- PCR).

**pN1** Metástasis en 1 a 3 ganglios linfáticos axilares, y / o en los ganglios mamaros internos con afectación microscópica detectada por disección del ganglio linfático centinela pero no clínicamente aparente.

pN1 (mi) Micrometástasis (mayor de 0,2 mm, no superior a 2,0 mm).

pN1a Metástasis en 1 a 3 ganglios linfáticos axilares.

pN1b Metástasis en ganglios mamaros internos con afectación microscópica detectada por disección del ganglio linfático centinela pero no clínicamente aparente.

pN1c Metástasis en 1-3 ganglios linfáticos axilares y en ganglios linfáticos mamaros internos con afectación microscópica detectada por disección del ganglio centinela pero no clínicamente aparente (la afectación mamaria interna asociada con más de 3 ganglios linfáticos axilares positivos se clasifica para

reflejar el aumento de la carga tumoral).

**pN2** Metástasis en 4 a 9 ganglios linfáticos axilares, o en ganglios linfáticos mamaros internos clínicamente con afectación aparente en *ausencia* de metástasis en los ganglios linfáticos axilares.

pN2a Metástasis en 4 a 9 ganglios linfáticos axilares (al menos un depósito tumoral mayor de 2,0 mm).

pN2b Metástasis en ganglios linfáticos mamaros internos clínicamente detectables en *ausencia* de metástasis en ganglios linfáticos axilares.

**pN3** Metástasis en 10 o más ganglios linfáticos axilares, o en los ganglios infraclaviculares, o en ganglios mamaros internos ipsilaterales clínicamente detectables; en presencia de 1 o más ganglios linfáticos axilares positivos, o en más de 3 ganglios linfáticos axilares clínicamente negativos con metástasis en los ganglios mamaros internos, o en los ganglios supraclaviculares ipsilaterales.

pN3a Metástasis en 10 o más ganglios axilares, con al menos un depósito tumoral mayor de 0,2 cm, o metástasis en ganglios infraclaviculares.

pN3b Metástasis en ganglios mamaros internos ipsilaterales clínicamente detectables en presencia de 1 o más ganglios axilares afectados; o en más de 3 ganglios axilares y en ganglios de la mamaria interna con afectación microscópica con disección del ganglio centinela, pero no clínicamente aparente.

pN3c Metástasis en ganglios supraclaviculares ipsilaterales.

**M METÁSTASIS A DISTANCIA**

**Mx** Desconocidas.

**M0** No existen.

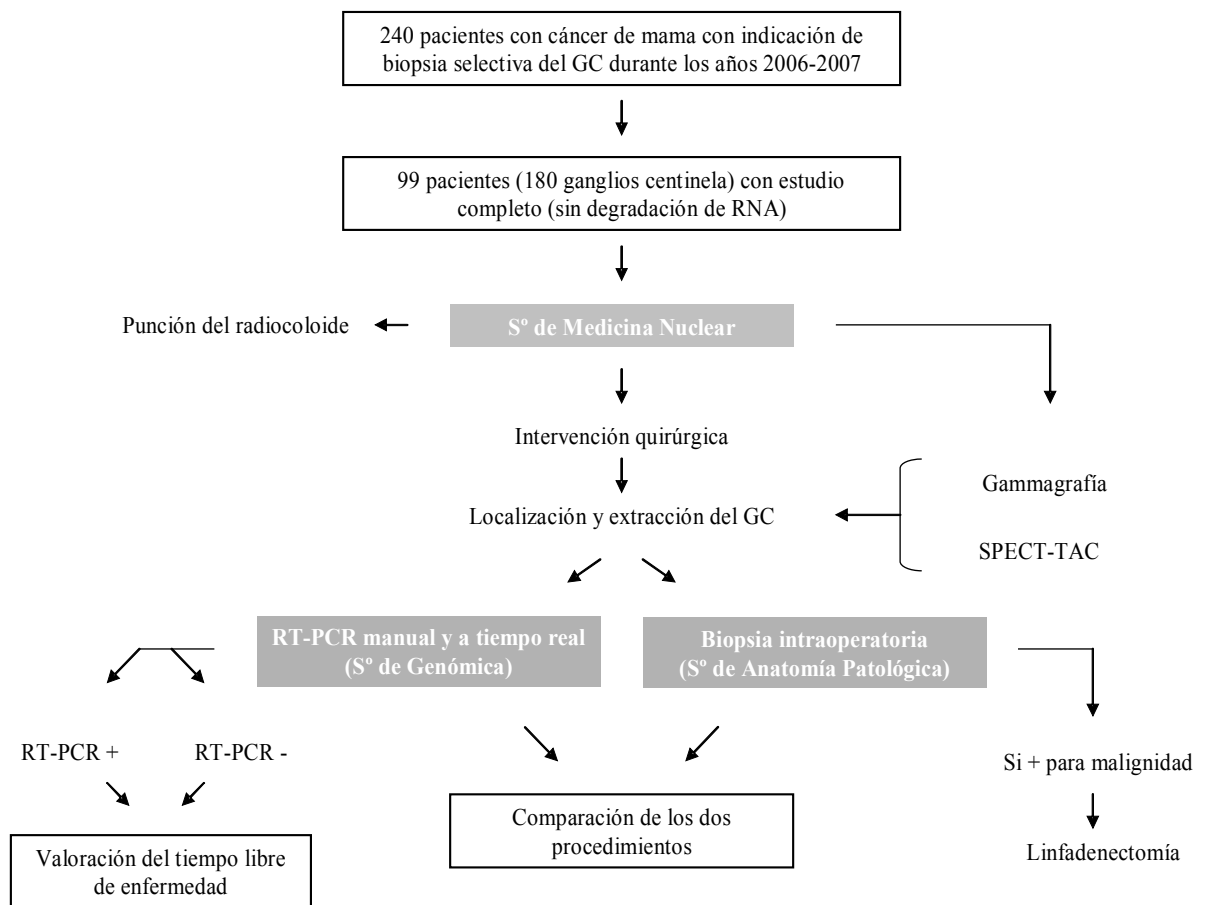
**M1** Sí existen.

\*ENFERMEDAD DE PAGET: Tumor maligno de la mama poco frecuente. Posee células características, las células de Paget, que son claras, redondeadas y con pérdida de los puentes intercelulares. Origina una lesión en el complejo areola-pezones pruriginosa y eczematosa.

\*\*CARCINOMA INFLAMATORIO (T4d): Produce metástasis con gran rapidez, por lo que es considerado un cáncer de mal pronóstico. Su manifestación clínica fundamental es similar a un proceso inflamatorio por invasión de los linfáticos superficiales. El tratamiento de elección es comenzar con tratamiento sistémico asociado o no a radioterapia, valorando en un segundo tiempo la realización de tratamiento quirúrgico.

\*\*\*CÉLULAS TUMORALES AISLADAS (ATC): se definen como células tumorales únicas o grupos de células pequeñas no superior a 0,2 mm, por lo general sólo detectado por inmunohistoquímica (IHC) o métodos moleculares, pero que puede ser verificada en estudios con hematoxilina-eosina.

El proceso llevado a cabo en el estudio se muestra en el algoritmo representado en la Figura 6, donde se visualiza de manera esquemática los diferentes pasos por los que la muestra del ganglio centinela va a transitar.



**Figura 6.** Algoritmo del procedimiento realizado en el estudio presentado. GC: Ganglio centinela. S°: Servicio. SPECT-TAC: Tomografía computarizada por emisión de fotones simples-tomografía axial computarizada. RT-PCR: Técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa.

## **II. MÉTODO DE LOCALIZACIÓN DEL GANGLIO CENTINELA**

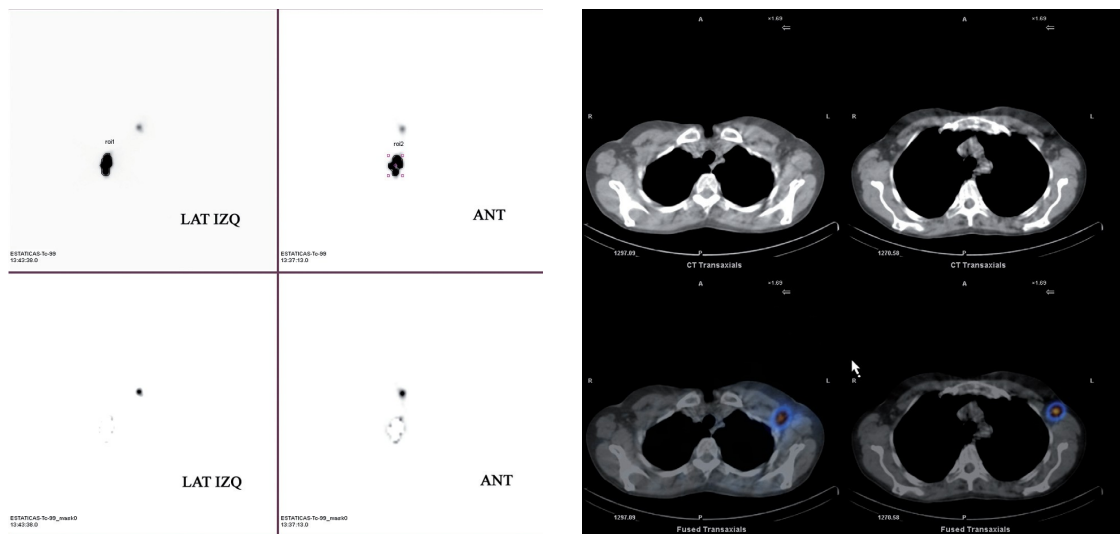
En el Hospital Clínico “San Carlos” la técnica de la biopsia selectiva del ganglio centinela se realiza mediante la inyección de un isótopo radiactivo Tc-99m (tecnecio 99 metaestable) a una dosis de 0,1 mCi (3,7MBq). La administración es intradérmica y se puede realizar en diferentes puntos: intratumoral, peritumoral o subareolar. En nuestro centro se realiza a nivel subareolar por ser la localización que mejores resultados de migración ha aportado tras la validación de la prueba<sup>26</sup>. La inyección se debe administrar con un mínimo de 4 horas y un máximo de 24 horas con respecto a la cirugía, en función de la dosis y de la vida media de isótopo radiactivo.

Posteriormente se lleva a cabo una gammagrafía y una tomografía computarizada por emisión de fotones simples-tomografía axial computarizada (SPECT-TAC), por parte del Servicio de Medicina Nuclear. La realización del SPECT-TAC se realiza puesto que en un estudio realizado en el año 2008, en el Hospital Clínico “San Carlos”, se concluyó que ganglios no detectados en la gammagrafía planar sí se visualizaban mediante el SPECT-TAC, disminuyendo así el número de falsos negativos, y se demostró que depósitos interpretados en la gammagrafía como ganglios correspondían a captación fuera del territorio linfático, disminuyendo así el número de falsos positivos<sup>52</sup>.

A todas las pacientes incluidas en este estudio se les inyectó, el día previo a la cirugía, nanocoloides marcados con <sup>99m</sup>Tc con un tamaño de partícula inferior a 80 nanómetro (nm), en cuatro jeringas de 1 mCi y 0,2 ml de volumen cada una. Se practicaron 4 inyecciones intradérmicas periareolares.

La adquisición de las imágenes se realizó pasados entre 60 y 90 minutos tras la inyección, llevándose a cabo imágenes planares 60 minutos después de la inyección e inmediatamente después se realizó el estudio SPECT-TAC. No obstante, se dieron casos donde no se observó migración a los ganglios linfáticos, por consiguiente se adquirieron las imágenes a las 20 horas postinyección. Las proyecciones de dichas imágenes planares fueron dos, una anterior y otra lateral del lado de la lesión.

Para las imágenes planares se utilizó una gammacámara convencional de dos cabezas (Sopha Camera DST; Sopha Medical Vision International, Bue Cedex, France) con colimadores de baja energía y resolución ultra alta (LEUHR). En segundo lugar, para el estudio SPECT-TAC se utilizó un equipo compuesto por una gammacámara de dos cabezas con un tubo de rayos X de baja dosis (Infinia Hawkeye 4, General Electric Medical System, Milwaukee WI, USA) con colimadores de baja energía y alta resolución (LEHR). Un ejemplo de un caso donde se realizó gammagrafía y posterior SPECT-TAC se muestra en la Figura 7<sup>52</sup>.



**Figura 7.** Imagen de gammagrafía convencional donde se visualiza un único depósito de radiotrazador, en las imágenes planares, con un posible trayecto hacia él. La SPECT-TAC demuestra dos ganglios centinela, uno más caudal, a la derecha, y el segundo más craneal, a la izquierda, ambos en el nivel I de Berg<sup>52</sup>.

### **III. MÉTODO QUIRÚRGICO**

La técnica quirúrgica, empleada en el estudio, consiste en la realización de una incisión a nivel axilar con posterior visualización directa para realizar la disección del ganglio centinela, de este modo cualquier ganglio de características inflamatorias debe ser extirpado para su posterior estudio, al igual que todos los ganglios marcados. Para la búsqueda del ganglio centinela se empleó una sonda gammadetectora (Europrobe, Eurorad, Strasbourg, Francia) con un cristal de teluridio de cadmio (CdZnTe) de  $5 \times 5 \times 3$  mm<sup>3</sup> diseñado para medias energías (20–170 KeV). Se extirparon el ganglio linfático con mayor actividad (cps) y todos los ganglios con una actividad superior al 10 % de la mostrada por aquel. A estos ganglios se les realiza un contaje “in vivo” y otro “ex vivo” y se envían para biopsia intraoperatoria. Posteriormente se conservan en tubos con RNA Later<sup>®</sup> (Ambion) para que no se degrade el RNA y, a continuación, se transportan al Servicio de Genómica.

Si el resultado intraoperatorio del ganglio centinela resulta “positivo” para malignidad se realiza linfadenectomía axilar en el mismo acto quirúrgico. También es preciso, la extrapolación del valor del contaje de la base, es decir, el contaje del resto de la axila, que debe ser inferior al 10% del contaje “ex vivo” más alto de los ganglios centinelas, o bien, ser inferior a un 25% del contaje “ex vivo” más bajo de los mismos, con el objetivo último de verificar la ausencia de algún otro ganglio centinela.

La recogida de muestras del ganglio centinela debe realizarse con gran cautela, puesto que exige una serie de precauciones a tener en cuenta:

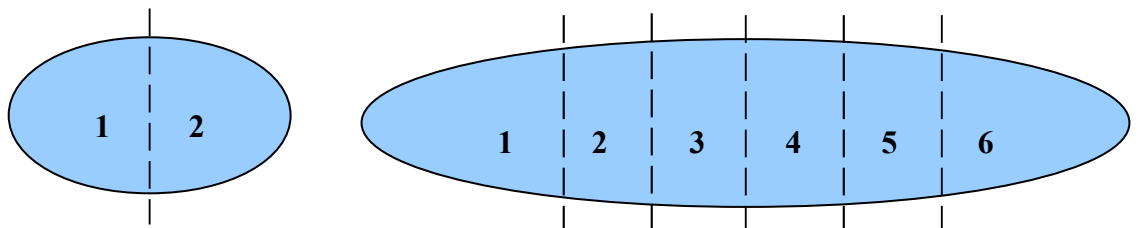
- Reducir al mínimo el riesgo de contaminación de la muestra del ganglio linfático con tejido mamario o tumoral primario. Esto se debe a la posibilidad de obtener un falso positivo en el análisis. Con el objetivo de disminuir esta contaminación se debe realizar la recogida con instrumental quirúrgico y bandejas quirúrgicas limpias.
- El tejido de la muestra se deberá colocar en un recipiente de transporte, con la identificación adecuada.
- Para disminuir el riesgo de degradación del RNA es preciso que el ganglio linfático se prepare lo antes posible. El tejido permanece estable a temperatura ambiente durante 45 minutos después de su extracción.

#### IV. MÉTODO DE ANÁLISIS DE GANGLIO CENTINELA Y PIEZA TUMORAL

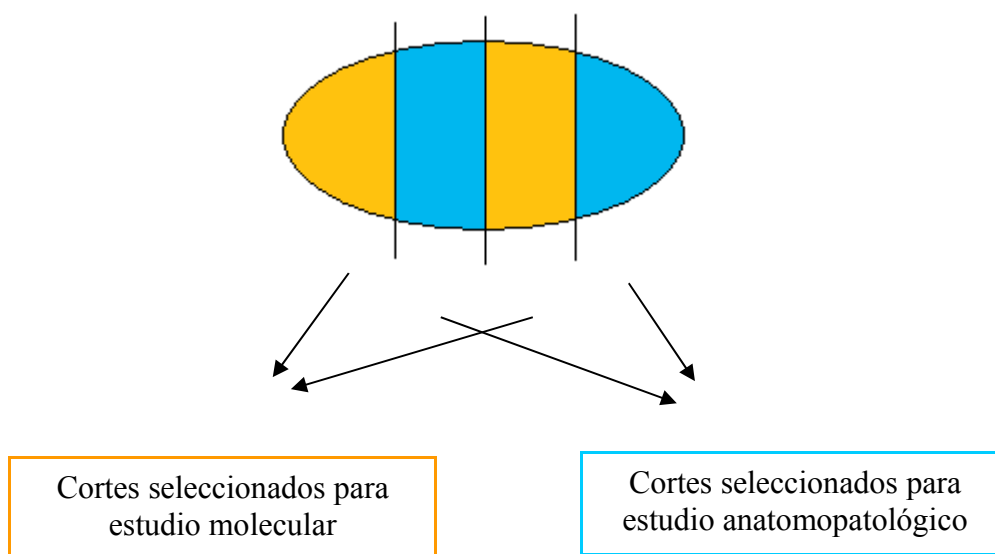
##### IV.1. ESTUDIO POR HEMATOXILINA-EOSINA E INMUNOHISTOQUÍMICA

Para intentar 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 en tiempo real. Un ejemplo de la distribución compartida de los ganglios linfáticos se muestra en la Figura 8.

Las secciones de tejido seleccionadas para estudio histológico fueron procesadas para citología intraoperatoria y/o cortes congelados, y para tinción permanente con Hematoxilina-Eosina, acorde a lo estandarizado por el Servicio de Anatomía Patológica.



Ejemplo de cortes en función del tamaño del ganglio centinela extraído



**Figura 8.** Distribución de las secciones realizadas en un ganglio centinela para posterior estudio en Biología Molecular y Anatomía Patológica.

Cuando el ganglio centinela llega al Servicio de Anatomía Patológica se secciona en tres partes, y cada una de ellas se emplea para: realizar estudio citológico, estudio en parafina, inmunohistoquímica y microsecciones para determinar micrometástasis, siempre que sea posible por el tamaño del ganglio, y, la última porción, se guarda para futuros estudios. Se llevará a cabo linfadenectomía axilar en aquellos casos de biopsia intraoperatoria maligna o biopsia diferida que informe de positivo para malignidad, tanto si se diagnostican macrometástasis como micrometástasis. Por el contrario, no se realizará este acto quirúrgico si el resultado de RT-PCR es positivo para malignidad.

En Anatomía Patológica, el estudio en la pieza tumoral de los receptores inmunohistoquímicos, tales como los de origen hormonal (de estrógenos y progesterona), el oncogén HER-2neu y el índice Ki 67, también posee una gran

relevancia. La positividad de la muestra tumoral para los receptores hormonales se puede agrupar de diferentes maneras, claro ejemplo de ello es, la clasificación por cruces (+/+++; ++/+++; +++/+++), por porcentaje (<25%; 25-50%; >50%), o bien por fracciones (x/8). En el estudio presentado la distribución de los receptores hormonales se realizó mediante porcentajes, aunque en el momento actual se está estableciendo mediante fracciones.

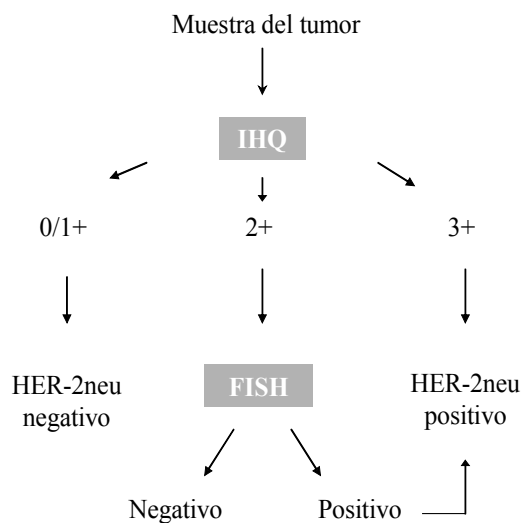
En segundo lugar, el oncogén HER-2neu<sup>53</sup> se puede determinar de diversas formas:

- Técnicas de inmunohistoquímica (IHQ). Esta técnica determina la sobreexpresión de la proteína HER-2neu mediante anticuerpos dirigidos específicamente contra un epítipo de dicha proteína en el tejido tumoral. A causa de su elevada sensibilidad y especificidad, al igual a que es una técnica económica, es la más empleada. Los tumores cuya tinción es más intensa se consideran positivos. Esto es valorado por el observador, mediante una escala semicuantitativa, organizada desde el 0 al 3, siendo el 0 la ausencia de detección y el 3 la expresión intensa. Por consiguiente se considera que el oncogén HER-2neu es positivo si el valor es 3+, negativo si es 0 o 1+ y dudoso si es 2+.
- Técnicas de FISH (fluorescence in situ hybridation). Se realiza la detección de la amplificación del gen HER-2neu, evaluando de manera directa el número de copias del gen, gracias a sondas de ADN complementario marcadas para detectar las secuencias específicas por hibridación y comparándolo con un control. Esta técnica posee una elevada sensibilidad y especificidad, superior a la IHQ, pero es más cara y no está disponible en todos los centros. Mediante dicha

técnica se consiguen resultados positivos o negativos, es decir cuantitativos y objetivos, y permite discriminar la positividad en casos de IHQ 2+.

- Técnicas de CISH (chromogenic in situ hybridation). Dicha técnica es similar a las del FISH, pero emplea sondas marcadas con peroxidasa. Se pueden considerar similares al FISH, pero falta experiencia en su empleo.

En el estudio presentado el oncogén HER-2neu se estudia mediante las dos primeras técnicas, IHQ y FISH (Figura 9), habiéndose obtenido el mayor número de resultados mediante IHQ.



**Figura 9.** Esquema sobre las recomendaciones para la determinación del oncogén HER-2neu<sup>53</sup>.

La positividad de la muestra tumoral para el índice Ki 67 se va a agrupar mediante una distribución según porcentajes (<25%; 25-50%; >50%).

*IV.2. METODOLOGÍA BIOMOLECULAR (DETERMINACION DE MARCADORES MEDIANTE TECNICA DE RT-PCR)*

La determinación de los marcadores utilizados para el diagnóstico de micrometástasis en el ganglio centinela ha sido realizada en el laboratorio de Biología Molecular del Hospital Clínico “San Carlos”.

La técnica empleada para el análisis del ganglio centinela ha sido la RT-PCR (retro-PCR). Esta técnica es la combinación de la reacción en cadena de la polimerasa y transcripción reversa. Se han utilizado dos tecnologías:

- a) RT-PCR convencional.
- b) RT-PCR a tiempo real.

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

*IV.2.a. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS*

Debido a que para el estudio de la expresión de los marcadores necesitamos trabajar a partir del RNA, la determinación de los mismos debe realizarse bajo condiciones libres

de RNAsas. Además existen una serie de sustancias que 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.
  
- Pacientes con diagnóstico de otro tipo de cáncer, por ejemplo el linfoma, pueden no ser candidatas adecuadas para el análisis de la técnica de reacción de RT-PCR. Esto se debe a que los ganglios linfáticos de estos pacientes pueden dar un resultado falso positivo.
  
- La contaminación de la muestra con tejido mamario o tumoral primario puede dar un resultado falso positivo.
  
- Por el contrario, ni colorantes de rastreo ni el tecnecio 99 son sustancias que interfieran en la reacción de RT-PCR a tiempo real utilizada en nuestro centro.

Una vez extraído el ganglio centinela en el acto quirúrgico, se recoge una porción de la muestra para la realización del estudio biomolecular. Para ello, es preciso la preservación del ganglio centinela en una solución estabilizadora de RNA, RNA Later® (Ambion) que va a permitir el traslado y conservación, en condiciones óptimas, hasta el laboratorio de Genómica.

En el Servicio de Genómica se procede a la extracción del RNA de los tejidos mediante el RNeasy Mini Kit (Qiagen). Las muestras ganglionares se homogenizan en una mezcla de  $\beta$ -mercaptoetanol y un tampón específico (buffer) 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  $-80^{\circ}\text{C}$ . El objetivo último es obtener entre 0,3 y 3  $\mu\text{g}$  de RNA total por cada miligramo de tejido de la muestra del ganglio centinela.

#### *IV.2.b. TÉCNICA RT-PCR CONVENCIONAL*

Después de haber extraído el RNA se lleva a cabo la RT-PCR para el análisis de la expresión de la CK19 y de la MG, de manera independiente. Ambos métodos se analizan mediante un kit de OneStep RT-PCR (QIAGEN). En la RT-PCR de la CK 19 y de la MG se emplean unos cebadores (primer) de RNA específicos, Tabla 3 y 4.

**Tabla 3.** Primers empleados en la RT-PCR convencional de la citoqueratina 19.

***Primer Sentido:*** 5' – AGA TGA GCA GGT CCG AGG TTA-3'

***Primer AntiSentido:*** 5' – CCT GAT TCT GCC GCT CAC TAT CA-3'

**Tabla 4.** Primers empleados en la RT-PCR convencional de la mamoglobina.

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

***Primer AntiSense:*** 5' – TCT GTG AGC CAA AGG TCT TGC AGA-3'

Se prepara la mezcla de reacción compuesta por diferentes elementos, mostrados en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Mezcla de la reacción para el estudio de la citoqueratina 19 y mamoglobina, mediante el OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN). Primer S: Primer Sentido. Primer AS: Primer Antisentido.

CITOQUERATINA 19 y MAMOGLOBINA		
Componente	Volumen	Concentración Final
Agua sin RNasas	1 $\mu$ l	--
5x Buffer	5 $\mu$ l	1x
dNTP Mix	1 $\mu$ l	400 mM de cada dNTP
Primer S	1 $\mu$ l	0,6 $\mu$ M
Primer AS	1 $\mu$ l	0,6 $\mu$ M
Enzime mix	1 $\mu$ l	--
RNA	5 $\mu$ l	--

La mezcla de enzimas que se emplea para realizar la reacción con el RNA contiene: la enzima retrotranscriptasa, la enzima Taq polimerasa, los dinucleótidos trifosfato (dNTPs), los primers y un tampón específico de cloruro magnésico.

Tras realizar una adecuada mezcla de la reacción con el RNA del ganglio centinela a estudio, se procede a la amplificación de dicho RNA mediante un termociclador, que somete a la mezcla obtenida a diferentes ciclos de temperatura y tiempo diferentes (34 ciclos), Tabla 6.

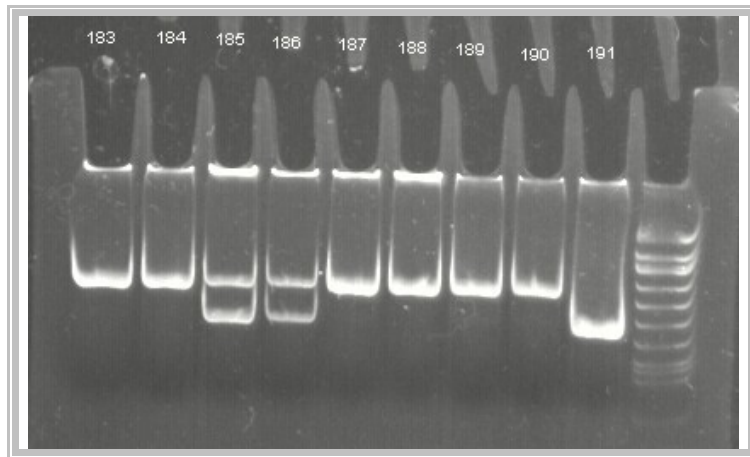
**Tabla 6.** Ciclos del programa del termociclador para la amplificación del RNA de la citoqueratina 19 y mamoglobina.

	<b>CITOQUERATINA 19</b>	<b>MAMOGLOBINA</b>
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*

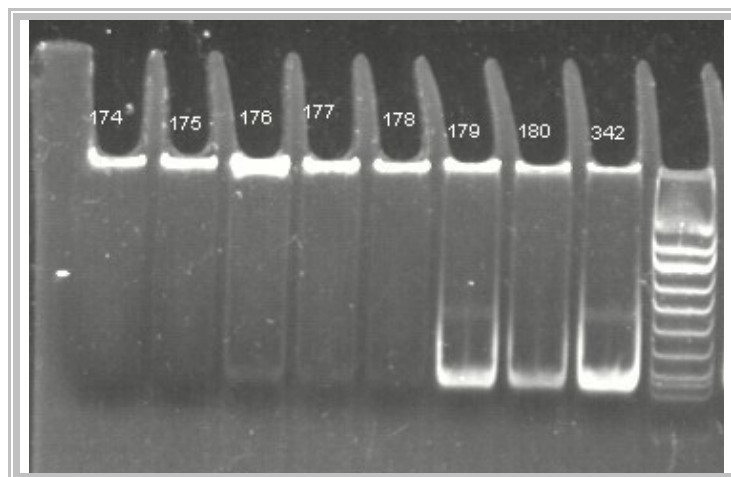
La diferencia a la hora de realizar la amplificación del DNA para la citoqueratina 19 y la mamoglobina es la temperatura annealing, que en el caso de la citoqueratina 19 es de 60°C durante 30 segundos, mientras que la mamoglobina es de 65°C durante 30 segundos. Esta temperatura de annealing es la que da la especificidad de la reacción.

A continuación, se procede a realizar la electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%, empleándose 130 V durante 70 minutos. Posteriormente, la muestra se somete a la acción de luz ultravioleta con lo que se observa la migración, de los amplificados de DNA de cada paciente, en función del peso molecular, al igual que la migración del marcador del peso molecular (Figura 10 y 11). La positividad de la muestra a citoqueratina 19 y mamoglobina será en todos aquellos casos en los que se observe una banda de peso molecular acorde al tamaño del amplificado.

En el caso de la PCR de la citoqueratina 19 se amplifican dos productos, sólo uno de ellos es la citoqueratina 19, puesto que se confirmó mediante secuenciación.



**Figura 10.** Migración tras electroforesis observada mediante luz ultravioleta del DNA amplificado para la citoqueratina 19, de cada paciente, y del marcador del peso molecular. Resultando positivo los casos número: 185, 186 y 191.



**Figura 11.** Migración tras electroforesis observada mediante luz ultravioleta del DNA amplificado para la mamoglobina, de cada paciente, y del marcador del peso molecular. Resultando positivos para mamoglobina, los casos número: 179, 180 y 342.

Si el resultado de las muestras de ganglio centinela resultan negativas tanto para citoqueratina 19 como para mamoglobina, se debe valorar la integridad del RNA estudiado. Para comprobar dicha integridad se debe correr el RNA total en un gel de agarosa al 1% en condiciones desnaturalizantes. Posteriormente se procede a teñir con bromuro de etidio y, por último, se expone a radiación ultravioleta. Como resultado, se debe observar las bandas de las subunidades 28S y 18S del RNA ribosómico, para confirmar que el RNA a estudio posee una adecuada integridad. Si no fuera de este modo, es decir el RNA no se encuentra de manera íntegra, no se puede asegurar que el ganglio centinela sea negativo con certeza.

La técnica RT-PCR convencional conlleva, por lo tanto, cinco pasos bien definidos, la preservación del ganglio centinela en RNA later, la extracción adecuada del RNA, la RT-PCR de la citoqueratina 19 y de la mamoglobina, la realización de la electroforesis en un gel de poliacrilamida y, por último, la valoración de la integridad del RNA en todos aquellos casos de resultado negativo para malignidad en el ganglio a estudio. Por consiguiente, es una técnica cuyo resultado no se va a obtener el mismo día de la intervención quirúrgica.

#### *IV.2.c. TÉCNICA RT-PCR A TIEMPO REAL*

En el Laboratorio de Genómica se lleva a cabo la técnica RT-PCR a tiempo real mediante el GeneSearch™ Breast Lymph Node (Veridex), que permite el estudio de la expresión del RNA de los marcadores: mamoglobina y citoqueratina 19 para estudiar la posible presencia de micrometástasis. Este análisis emplea la RT-PCR a tiempo real

para generar datos cuantitativos de expresión de genes como la mamoglobina y la citoqueratina 19. 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.

La RT-PCR a tiempo real se realiza mediante el GeneSearch™, que emplea una reacción homogénea, de un paso y completamente controlada, incluyendo tres marcadores génicos (mamoglobina, citoqueratina 19 y un gen de control interno, el porfobilinógeno desaminasa, PBGD), detectados gracias a sondas de DNA específicas de la secuencia. La RT-PCR a tiempo real así como la interpretación de los resultados se llevó a cabo en el Smart Cycler siguiendo las indicaciones preestablecidas del distribuidor.

Los resultados se obtienen a partir del valor del ciclo umbral (threshold cycle o Ct). 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 la PCR. Si 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 (Figura 12).

Los controles externos que deben ser incluidos en cada amplificación son:

- Control positivo: tiene marcadores de cáncer únicamente (MG y CK19).
- Control negativo: contiene PBGD solamente.

Siendo los valores umbrales de cada control:

- Mamoglobina: Ct menor o igual a 31.
- Citoqueratina 19: Ct menor o igual a 30.
- PBGD: Ct menor a 36.

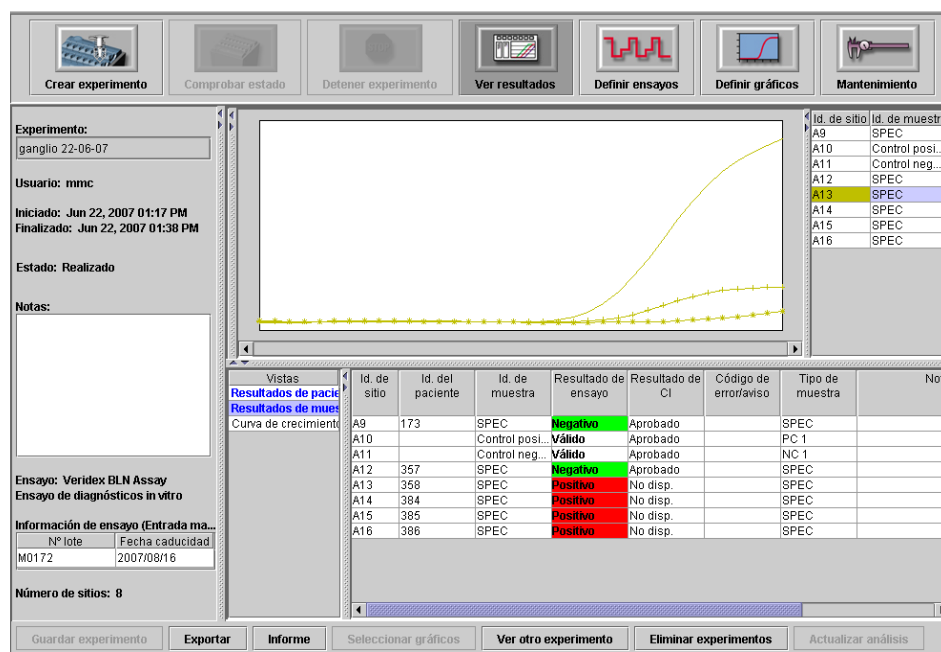


Figura 12. Resultados obtenidos mediante RT-PCR a tiempo real.

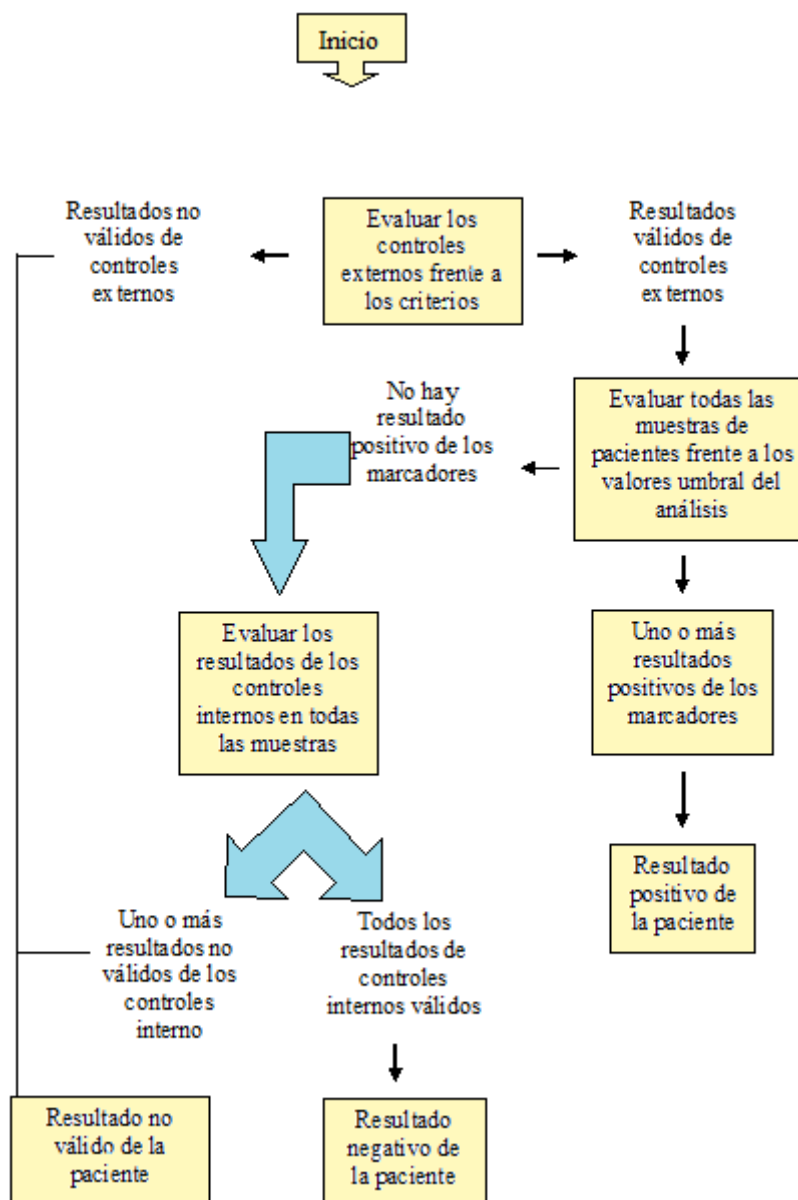
Los resultados que pueden ser obtenidos en función del valor de Ct son:

- 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 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.

Las limitaciones de la RT-PCR en tiempo real empleada en el Hospital Clínico “San Carlos” son las siguientes:

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

El árbol de decisión que se emplea para determinar el resultado del paciente es el representado en la Figura 13.



**Figura 13.** Árbol de decisión empleado para la determinación del resultado del paciente.

Como conclusión, la técnica RT-PCR a tiempo real sólo posee dos pasos en su realización, uno de ellos es la extracción del RNA y, el segundo, la realización de la RT-PCR mediante sondas específicas para cada marcador (mamoglobina, citoqueratina 19 y el controlador interno) a tiempo real. De este modo, se consigue un resultado de positivo o negativo para malignidad en un tiempo aproximado de 20 minutos.

## **V. METODOLOGÍA ESTADÍSTICA**

Con los datos obtenidos de este estudio se realiza un estudio descriptivo de las variables, extrapoladas de la historia clínica, que se muestran a continuación:

1. Datos de filiación de la paciente: nombre y apellidos, número de teléfono, número de historia clínica, edad.
2. Antecedentes personales como la presencia de alergia a algún medicamento o cualquier dato patológico de interés, o los antecedentes de intervenciones previas.
3. Antecedentes gineco-obstétricos. En este apartado es de importancia recoger datos como: la fecha de la última regla; toma de algún tratamiento hormonal a lo largo de la vida de la paciente; el número de gestaciones, especificando número de partos y abortos. También se revisa el dato sobre la administración puerperal de lactancia materna o artificial.
4. Dentro de los antecedentes familiares, es de gran relevancia el estudio de la presencia de algún familiar con cáncer de mama, ovario, colon o cualquier otro tipo de neoplasia.
5. Se debe indicar la manera de diagnosticar el tumor por primera vez: si fue gracias a una exploración por parte de la misma paciente o de un profesional médico; o bien si se realizó el diagnóstico gracias a una prueba complementaria (ecografía, mamografía...), siendo un hallazgo casual.
6. Datos de exploración mamaria, con la evidencia o no de nódulo palpable.

7. Se procede a la recogida de las pruebas complementarias realizadas, así como los resultados obtenidos:
  - Ecografía mamaria.
  - Mamografía convencional o digital.
  - Resonancia magnética.
8. Especificar el método de realización del diagnóstico de confirmación anatomopatológico:
  - P.A.A.F. (punción-aspiración con aguja fina).
  - B.A.G. (biopsia con aguja gruesa).
9. Resultado anatomopatológico del tumor, con la descripción del tamaño de la pieza quirúrgica, estirpe tumoral y receptores inmunohistoquímicos.
10. Número de ganglios centinelas observados en la migración y detectados en el campo quirúrgico.
11. Contaje en el punto de inyección, de los ganglios centinelas “ex vivo” y de la base.
12. Resultado anatomopatológico de la biopsia intraoperatoria. En dicho estudio se valoran los siguientes marcadores: el tamaño y la estirpe tumoral, el grado de diferenciación histológico y los marcadores inmunohistoquímicos.
13. Resultado de biología molecular de los ganglios centinelas, mediante RT-PCR manual y a tiempo real. En el estudio biomolecular, se establece un control del número de casos negativos y positivos para malignidad por medio de las diferentes secuencias empleadas en la RT-PCR.

Las variables cuantitativas se expresan mediante su mediana y desviación estándar, y la media y el rango; mientras que las variables cualitativas estudiadas se expresan en categorías.

El análisis del trabajo tiene como finalidad valorar los factores pronóstico en el cáncer de mama a tener en cuenta, como son los resultados inmunohistoquímicos de la pieza quirúrgica y la valoración de la afectación axilar, mediante la biopsia intraoperatoria del ganglio centinela o, en su defecto, por la linfadenectomía. De este modo, se pretende establecer el grado de repercusión de dichos parámetros y de los resultados de la RT-PCR cuantitativa a tiempo real en la recidiva tumoral, mediante un estudio estadístico Chi-cuadrado.

Este mismo análisis estadístico, Chi-cuadrado, se emplea para la comparación de los resultados de la técnica intraoperatoria RT-PCR, con los factores pronóstico del cáncer de mama que se han tomado como referente a lo largo de la historia, que son los resultados inmunohistoquímicos.

Una tabla de contingencia basada en la comparación mediante Chi-cuadrado de los resultados anatomopatológicos y los datos de afectación ganglionar obtenidos por la RT-PCR a tiempo real, establece los parámetros de agudeza diagnóstica de la prueba. Aunque dichos valores han sido usados por mucho tiempo como indicadores de la precisión de una prueba diagnóstica, existen otros métodos más modernos, como las curvas de operación característica del receptor (Receiver-Operating Characteristic, ROC) que se consideran de mayor consistencia como indicadores,

puesto que supera muchas de las limitaciones de los índices más tradicionales. Por tanto, en el estudio se realiza esta curva para valorar si el proceder diagnóstico a estudio, la RT-PCR cuantitativa a tiempo real, posee una alta precisión.

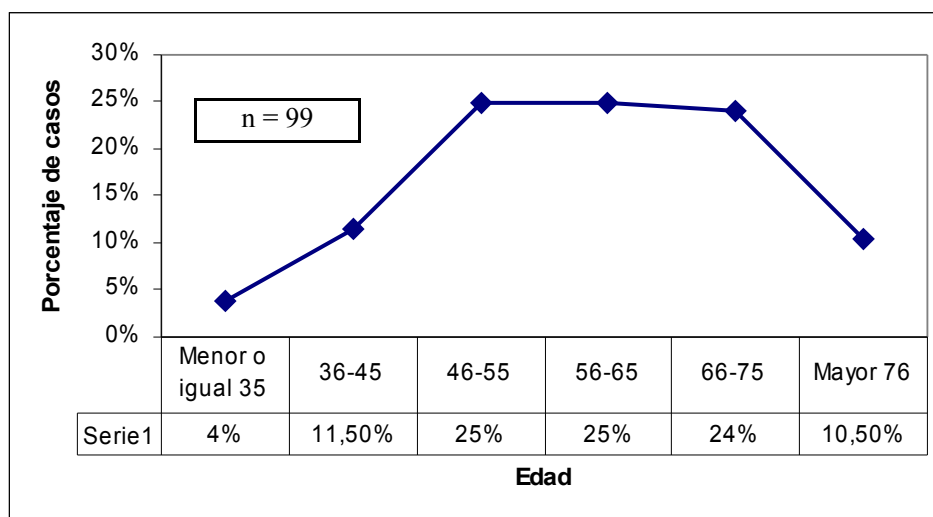
El último test estadístico empleado es el método de Kaplan-Meier, de gran utilidad en estudios donde el tamaño muestral no es muy elevado. Este método incorpora la idea del tiempo al que ocurren los eventos, en este caso de recidiva tumoral, durante el seguimiento llevado a cabo en las pacientes. Completando la valoración, por medio del test de Mantel-Haenszel, también denominado test de “Log Rank”, test de azares proporcionales y test de Mantel-Cox. Este estudio es de gran importancia para detectar diferencias cuando los logaritmos de las curvas de supervivencia de dos grupos a comparar son proporcionales. Estos grupos son aquellas pacientes con resultado negativo versus positivo de malignidad en la prueba RT-PCR cuantitativa a tiempo real en la técnica de biopsia selectiva de ganglio centinela.

Posteriormente, se ha llevado a cabo un estudio analítico, utilizando el programa estadístico SPSS 15.0, comparando las diversas variables con el fin de responder los objetivos expuestos en dicho apartado, estableciendo un nivel de significación del 5%.

## **RESULTADOS**

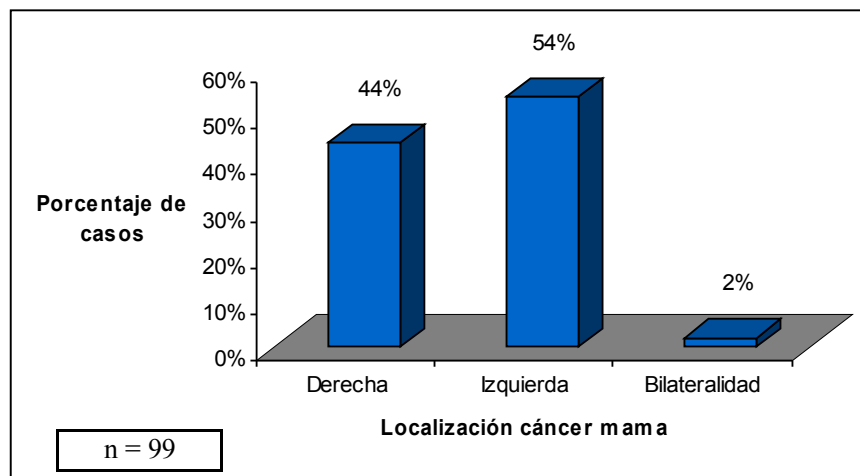
**I. ESTUDIO DESCRIPTIVO**

Las pacientes pertenecientes al estudio completan un tamaño muestral de 99 casos, con una mediana para la edad, en el momento del diagnóstico del cáncer de mama, de 58 años (rango de edad 45,08-70,92). La distribución etaria de los casos se refleja en la Figura 14.



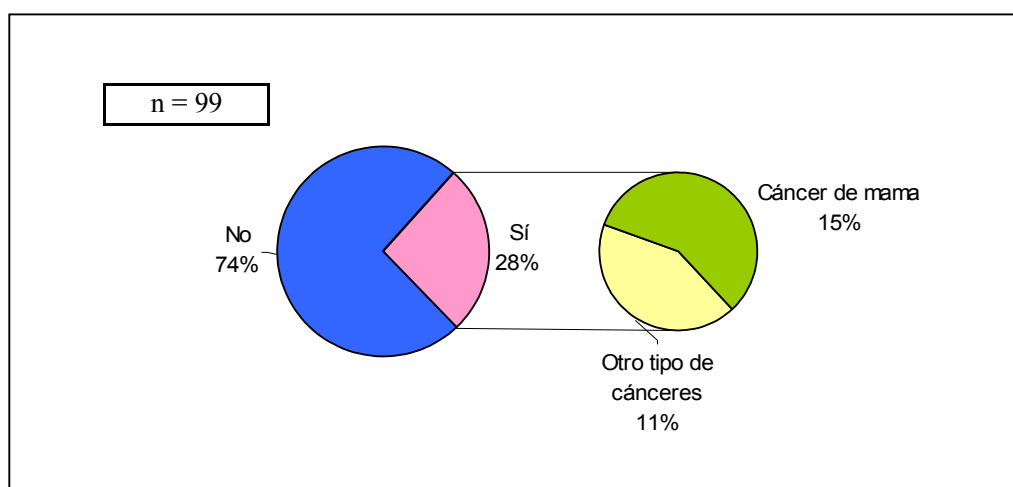
**Figura 14.** Distribución por edades de las pacientes en estudio. n: tamaño muestral.

La localización del tumor en función de la lateralidad se distribuye según se refleja en la Figura 15.



**Figura 15.** Frecuencia del cáncer de mama según localización. n: tamaño muestral.

Uno de los factores demográficos recogidos de las diferentes mujeres incluidas en el estudio fue los antecedentes familiares de interés, por un lado si poseían historia de patología oncológica en la familia y, por otro lado, si dicha enfermedad era propia de la mama. Los resultados obtenidos al respecto fueron los expuestos en el siguiente gráfico, Figura 16.



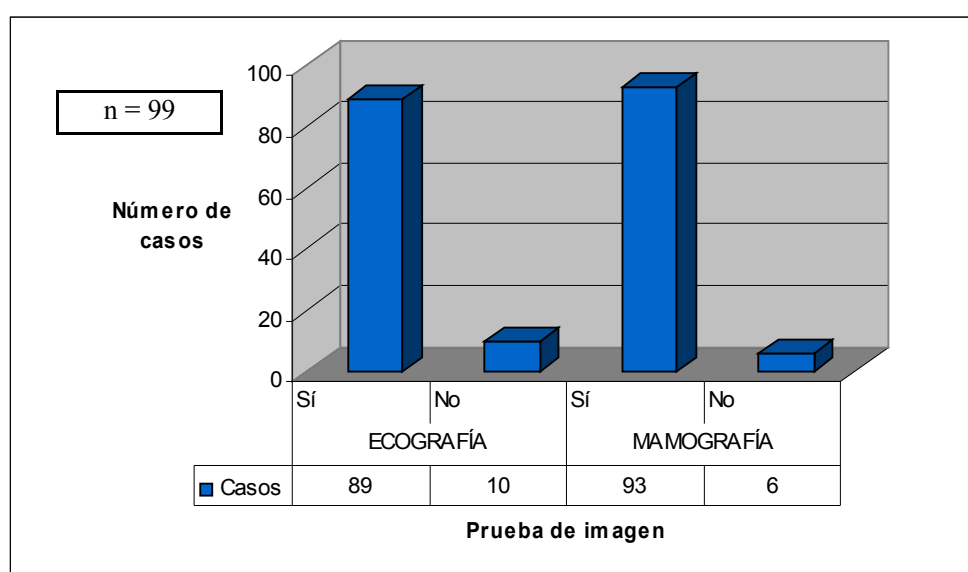
**Figura 16.** Antecedentes familiares de las pacientes a estudio. n: tamaño muestral.

En un segundo lugar, también resultó ser objeto de interés los antecedentes personales de las pacientes, se subdividieron en tres grupos: uno perteneciente a aquellas pacientes sin datos de interés (75 casos), un segundo grupo aquellas que padecieron patología oncológica no mamaria (4 casos) y un tercer subtipo propio de aquellas con algún tipo de lesión en la glándula objeto de investigación (20 casos). Estas lesiones mamarias que se han recogido fueron: un tumor Phyllodes, tres pacientes con intervenciones por fibroadenomas, cuatro mujeres con cuadros de mastitis previos, antecedentes de mastopatía fibroquística en cinco procesos, un quiste mamario, tres casos con lesiones precancerosas (carcinoma ductal in situ, enfermedad de Paget e hiperplasia ductal atípica) y tres pacientes con antecedentes de patología oncológica en la mama contralateral.

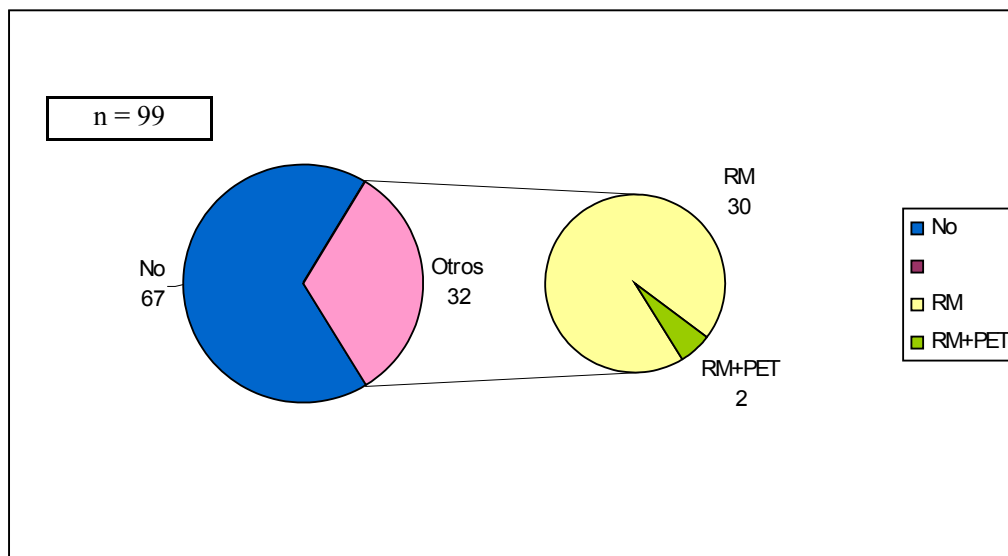
El empleo de administración exógena de hormonas sexuales femeninas, bien sea por la toma de anticonceptivos hormonales durante la edad fértil, o bien por el uso de terapia sustitutiva en la época de la menopausia, también se ha recogido en el trabajo. Un 78,8% (78 casos) de paciente no utilizaron ninguno de estos dos tratamientos a lo largo de su vida, mientras que un 5% (5 casos) sí recurrieron a dichas terapéuticas. En el 16,2% (16 casos) de las historias clínicas no se recogieron esta variable de gran importancia al constituir un factor de riesgo establecido para el cáncer de mama.

En el diagnóstico del cáncer de mama se emplean diferentes métodos, entre ellos cabe destacar la realización de una adecuada exploración física de la paciente, el estudio mediante ultrasonografía de la mama, el empleo de la mamografía y otras pruebas de imagen como son la resonancia magnética nuclear (RM) o la tomografía con emisión de

positrones (PET). La exploración meticulosa de la mama llegó al diagnóstico de lesión en 47 pacientes del estudio actual, pero en un 52,5% de los casos la palpación fue rigurosamente normal. La frecuencia de realización de ecografías y mamografías se refleja en las Figuras 17, por otro lado, en la Figura 18 se muestra el número de casos donde se realizaron pruebas diferentes a las anteriormente descritas.

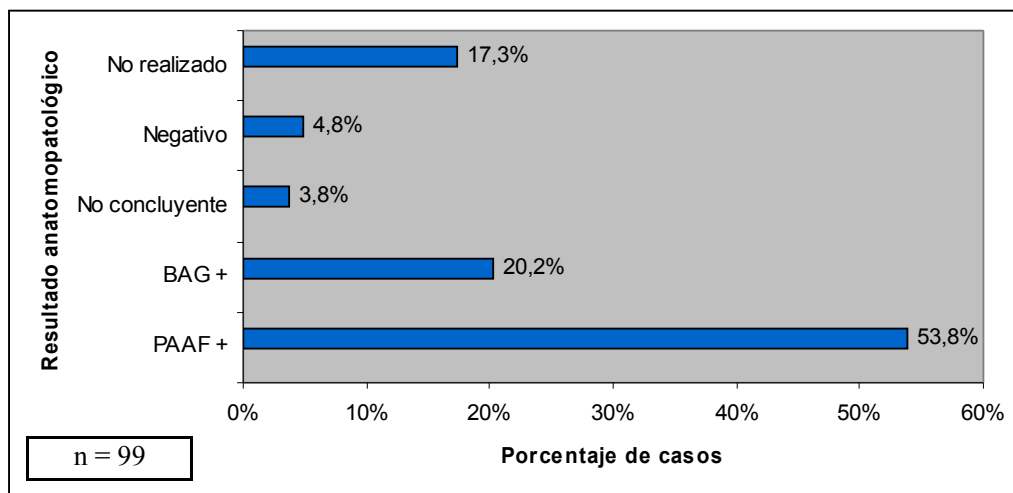


**Figura 17.** Número de pacientes en las que fueron realizadas las diferentes pruebas de imagen (ecografía y mamografía). n: tamaño muestral.



**Figura 18.** Número de casos, en valor absoluto, de las pacientes que fueron y no sometidas a otras pruebas de imagen diferentes a la ecografía y mamografía. n: tamaño muestral.

La realización de un estudio citológico y/o histológico de la lesión diagnosticada mediante las pruebas de imagen o la exploración física del clínico es imprescindible previa a la realización de una técnica quirúrgica con fines curativos o paliativos para la paciente a tratar. Como se explica en el apartado anterior de la Introducción, los diferentes métodos de diagnóstico anatomopatológico son múltiples, pero en las mujeres a estudio se han realizado o bien punción-aspiración con aguja fina (P.A.A.F.) o bien biopsia con aguja gruesa (B.A.G.), siendo los resultados posibles: positivos o negativos para malignidad y también pudiendo resultar no concluyente. La descripción de estos resultados anatomopatológicos se encuentra en la gráfica expuesta a continuación (Figura 19).



**Figura 19.** Distribución de los resultados del estudio anatomopatológico de lesiones mamarias. B.A.G. +: Biopsia con aguja gruesa positiva para malignidad. P.A.A.F. +: Punción-aspiración con aguja fina positiva para malignidad. n: tamaño muestral.

El tipo de intervención realizada en los diferentes sujetos de estudio varía en función de la indicación, por tanto, en base al diagnóstico prequirúrgico de la lesión tumoral. Las diferentes cirugías recogidas en la base de datos de la muestra fueron: exclusivamente técnica de biopsia intraoperatoria de ganglio centinela (5 casos); realización de tumorectomía asociada a ganglio centinela con o sin ampliación de márgenes del lecho quirúrgico (57 casos); mastectomía con o sin biopsia intraoperatoria de la lesión, previamente marcada radiológicamente con un arpón o palpable, más el estudio intraoperatorio del centinela (16 casos); y por último tanto la tumorectomía o mastectomía unida a la linfadenectomía axilar ipsilateral, previo marcaje y estudio del ganglio centinela (13 y 6 casos, respectivamente). Al mismo tiempo se describen 2 pacientes sometidas a mastectomía con reconstrucción inmediata, junto a la biopsia intraoperatoria del ganglio centinela. Tabla 7.

**Tabla 7.** Porcentaje de casos distribuidos en función del tipo de intervención realizada en el acto quirúrgico sometido a estudio, siendo el tamaño muestral de 99 pacientes. BSGC: Biopsia intraoperatoria de ganglio centinela.

	<b>TIPO DE INTERVENCIÓN</b>	<b>PORCENTAJE DE CASOS (%)</b>
<b>CIRUGÍA CONSERVADORA</b>	BSGC	5%
	Tumorectomía + BSGC	57,6%
	Tumorectomía + BSGC + Linfadenectomía axilar	13,1%
	<b>Total</b>	<b>75,7%</b>
<b>CIRUGÍA RADICAL</b>	Mastectomía + BSGC	16,2%
	Mastectomía + BSGC + Linfadenectomía axilar	6,1%
	Mastectomía + BSGC + Reconstrucción inmediata	2%
	<b>Total</b>	<b>24,3%</b>

Tamaño muestral, n = 99.

Como consecuencia de las intervenciones descritas con anterioridad, en este trabajo se recogen 180 muestras de ganglios centinelas, de 99 pacientes con carcinoma de mama. El 76,7% de las mujeres fueron sometidas exclusivamente a técnica de biopsia de ganglio centinela, por el contrario en 23 casos se realizó linfadenectomía axilar ipsilateral como consecuencia de la positividad del ganglio estudiado, suponiendo un 23,2% de las cirugías realizadas. La repartición de las pacientes, tanto en valor absoluto

como en porcentaje, en función del número de ganglios extraídos en la intervención se refleja en la siguiente tabla, Tabla 8.

**Tabla 8.** Frecuencia de casos en valor absoluto y porcentaje que han sido sometidos a una biopsia intraoperatoria de ganglio centinela o a una linfadenectomía axilar.

		Valor absoluto	Porcentaje (%)
<b>Ganglio Centinela</b>	1	23	23,2%
	2	30	30,3%
	3	16	16,2%
	4	5	5,0%
	Total	74	74,7%
<b>Linfadenectomía</b>	Menos 10	5	5,0%
	10 a 15	17	17,2%
	Más 15	2	2,0%
	Total	24	24,2%

Durante la técnica de biopsia selectiva intraoperatoria de ganglio centinela se procede a la determinación del contaje nuclear de las cuatro localizaciones de inoculación del radiotrazador, que en este trabajo se realiza a nivel periareolar, en los cuatro puntos cardinales, denominándose puntos de inyección. Para la valoración del contaje en los puntos de inyección, al igual que para la búsqueda del ganglio centinela se empleó una sonda gammadetectora, extirpándose el ganglio linfático con mayor actividad y todos los ganglios con una actividad superior al 10 % de la mostrada por aquel. A estos

ganglios se les realiza un conteo “in vivo” y otro “ex vivo” y se envían para biopsia intraoperatoria.

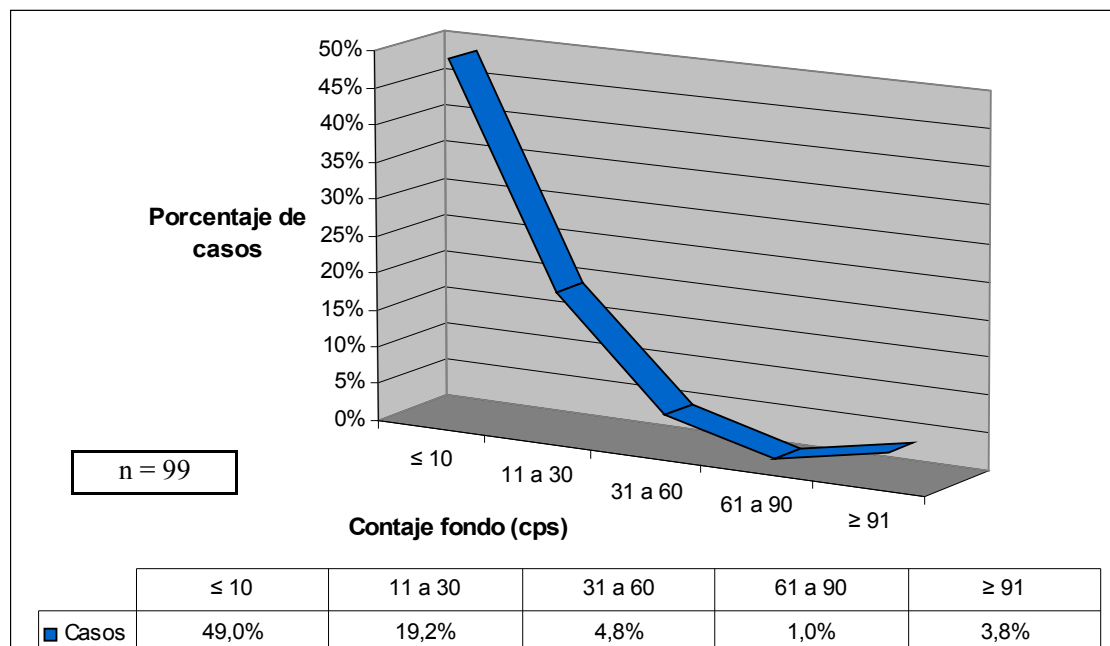
En la muestra no se ha podido determinar dicha cifra del conteo del primer ganglio en 8,6% pacientes, por falta de información tras el acto quirúrgico, correspondiendo a 9 casos. Por otra parte, un 39,4% de las pacientes presentaron un valor del primer ganglio centinela “ex vivo” de menos de 500 cps, siendo el grupo mayoritario y, en contraposición, lo más infrecuente es presentar conteos de primer ganglio superiores a 3000 cps (6,7%).

En paralelo, se puede realizar la descripción del segundo ganglio centinela, el grupo más frecuente (32,7%) es el mismo que en el primer ganglio centinela, conteo inferior a 500 cps, mientras que sólo el 2,9% de las pacientes muestran valores superiores a 3000 cps. Tabla 9. Es de importancia destacar que un 43,2% de las pacientes no presentaban el valor de conteo del segundo ganglio centinela, teniendo en cuenta que en un 57,2% de los casos se obtuvo un ganglio centinela exclusivamente.

**Tabla 9.** Distribución de contaje, en porcentaje, del primer y segundo ganglio centinela “ex vivo”. C.P.S.: Cuentas por segundo.

Contaje (cps)	1º ganglio centinela “ex vivo”	2º ganglio centinela “ex vivo”
Sin reseñar	8,6%	43,2%
Menos 500	39,4%	32,7%
500-1000	20,2%	7,7%
1000-2000	15,4%	8,6%
2000-3000	9,6%	4,8%
Más 3000	6,7%	2,9%

Aquellas pacientes donde se obtuvieron un tercer ganglio centinela para estudio presentaron un contaje inferior a 1000 cps en el 77,7% (14 casos). En el proceso con cuatro ganglios centinelas extraídos, este último presentó un valor de contaje mayor a 1000 sólo en un 20% de las mujeres (1 caso). El valor del contaje del fondo del lecho quirúrgico también presenta gran importancia durante el acto quirúrgico (Figura 20), en el estudio existe un 22,1% de casos donde no se ha reflejado dicha cifra.



**Figura 20.** Porcentaje de pacientes incluidas en los diferentes rangos de conteo de fondo del lecho quirúrgico axilar. C.P.S.: Cuentas por segundo. n: tamaño muestral.

El estudio del ganglio centinela se establece mediante el empleo de distintas secuencias pertenecientes, todas ellas, a la técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR). Las secuencias empleadas en el laboratorio de Genómica, son la mamoglobina y la citoqueratina 19. La Tabla 10 muestra la comparación de los distintos resultados para malignidad que las diversas técnicas: mamoglobina, citoqueratina 19, resultado por RT-PCR manual definitivo y RT-PCR a tiempo real. A todas las pacientes del estudio se les realiza el análisis del ganglio centinela mediante RT-PCR convencional, y, a un subgrupo de 88 ganglios (57 pacientes) de 180 recogidos en total, se les somete a la técnica RT-PCR a tiempo real.

De los 23 casos de linfadenectomías axilares realizadas se objetivaron positividad para malignidad del primer ganglio centinela en un 69,5% de las pacientes, en el resto de los casos se realizó la extracción completa del paquete ganglionar axilar por diagnóstico de micrometástasis en el segundo ganglio centinela biopsiado intraoperatoriamente (3 casos).

**Tabla 10.** Resultados de malignidad en función de las diferentes pruebas empleadas para la obtención de los mismos, números de casos en valores absolutos. RT-PCR tiempo real: Técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa. GC 1: Primer ganglio centinela. GC 2: Segundo ganglio centinela. GC 3: Tercer ganglio centinela. GC 4: Cuarto ganglio centinela. 1: positivo para malignidad. 2: negativo para malignidad. 9: no obtención de resultado definitivo con certeza.

		GC 1	GC 2	GC 3	GC 4
<b>MAMOGLOBINA</b>	1	75	36	9	2
	2	20	7	1	0
	9	1	0	0	0
	Sin reseñar	3			
<b>CITOQUERATINA 19</b>	1	78	40	10	2
	2	17	3	0	0
	9	1	0	0	0
	Sin reseñar	3			
<b>RT-PCR manual DEFINITIVO</b>	1	73	36	9	2
	2	22	7	1	0
	9	1	0	0	0
	Sin reseñar	3			
<b>RT-PCR a tiempo real</b>	1	40	24	3	1
	2	9	0	0	0
	9	6	1	1	0
	No realizado	42	17	6	1
	Material insuficiente	2	1	0	0

En paralelo al estudio anatomopatológico, histológico y biomolecular del ganglio centinela, también se realiza el análisis de la pieza quirúrgica. El tamaño tumoral en el momento del diagnóstico tuvo una mediana de 1,7 cm (+/- 0,90), con una distribución, según la clasificación TNM, reflejada en la Tabla 11.

**Tabla 11.** Distribución del tamaño tumoral en la pieza quirúrgica según la clasificación TNM.

TAMAÑO TUMORAL		Valor absoluto	Porcentaje (%)
T1	T1mic	1	1,0%
	T1a	3	3,0%
	T1b	17	17,2%
	T1c	50	50,5%
T2		16	16,1%
T3		1	1,0%
Sin reseñar		11	11,1%
<b>Total</b>		<b>99</b>	<b>99,99%</b>

A continuación se examinan las distintas características clínicas tumorales, entre ellas el diagnóstico anatomopatológico definitivo. Los resultados obtenidos de la investigación pormenorizada siguen la distribución descrita en la Tabla 12.

**Tabla 12.** Frecuencia de casos en valor absoluto y porcentaje por estirpe tumoral en el diagnóstico anatomopatológico de la pieza quirúrgica. Ca: Carcinoma.

ESTIRPE TUMORAL		Valor absoluto	Porcentaje (%)
Ca ductal in situ		5	5,0%
Ca invasor	Ductal	46	46,5%
	Lobulillar	11	11,1%
	Medular	1	1,0%
	Mucinoso	2	2,0%
	Crecimiento mixto	2	2,0%
	Sin especificar	23	23,2%
Ca papilar		1	1,0%
Desconocido		8	8,1%
<b>Total</b>		<b>99</b>	<b>99,9%</b>

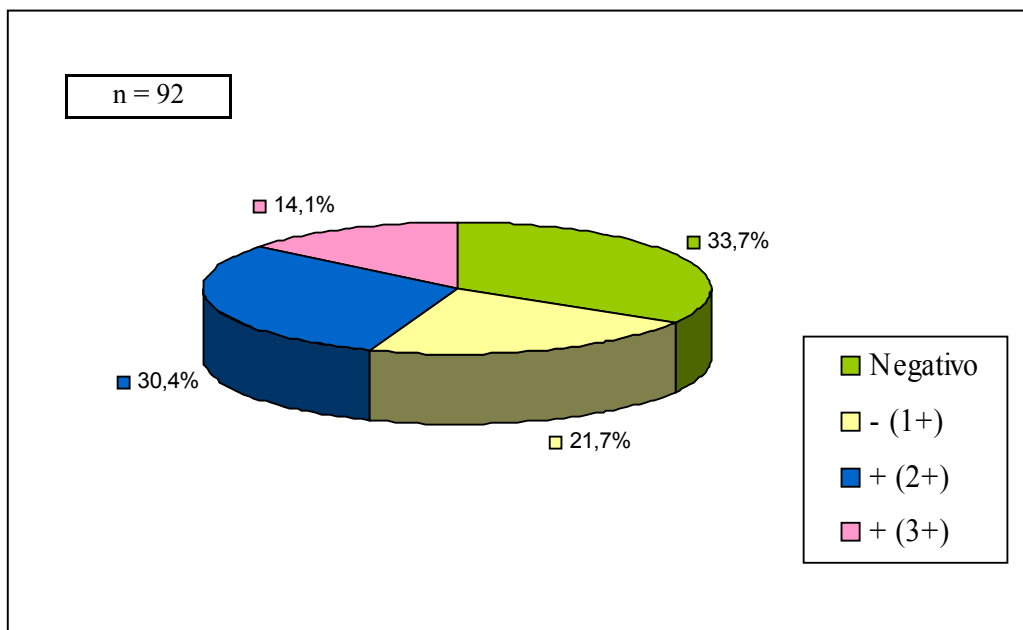
En el informe anatomopatológico es imprescindible reseñar el grado histológico tumoral así como el tipo de diferenciación celular del cáncer de mama que se está estudiando. Los tumores recogidos según el grado histológico más frecuentes son los que presentan un grado II (45,2% de los cánceres, 47 casos).

La diferenciación celular del tumor es importante para valorar la posible evolución de la enfermedad, por consiguiente es imprescindible su determinación y reseña posterior en el informe que se aporta al clínico. En el estudio existen 35 casos (35,3%) donde este dato no se ha podido obtener, un 9,1% (9 casos) de la muestra estudiada poseía una

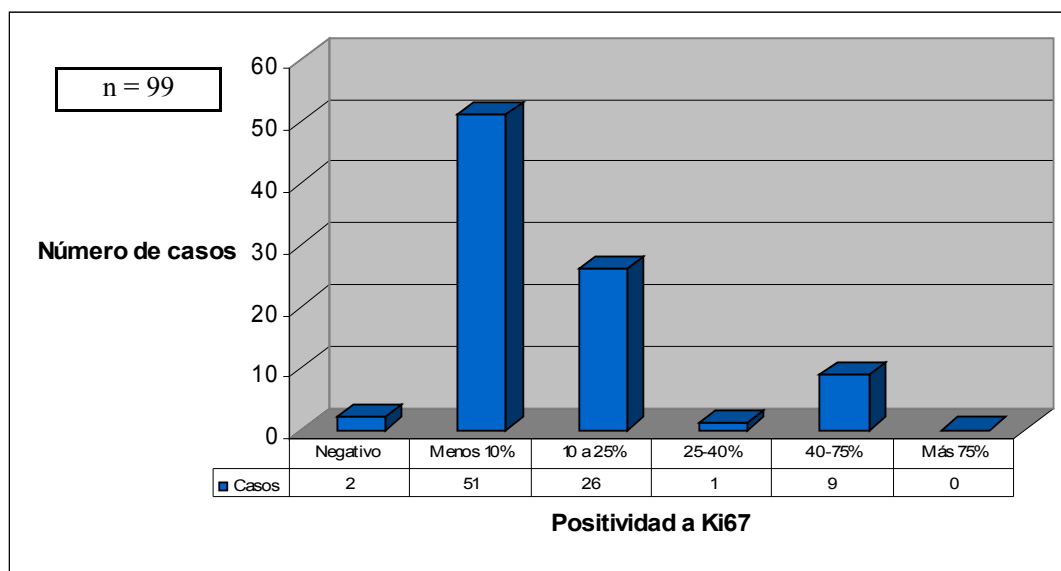
diferenciación pobre, por el contrario, la pieza tumoral tenía una buena diferenciación en 23 casos (23,2%) y moderada en 32 (32,3%).

En la pieza tumoral también es relevante el estudio de los receptores inmunohistoquímicos, tales como los de origen hormonal (de estrógenos y progesterona), el oncogén HER-2neu y el índice Ki 67. El mayor número de las pacientes de la muestra presentaron positividad mayor a un 75% para receptores hormonales, de estrógeno y progesterona, en un 47,4% y 45,4%, respectivamente, constituyendo el grupo mayoritario. Las piezas quirúrgicas fueron negativas para estos receptores en un 18,2% (16 pacientes), en ambos casos.

Otros marcadores inmunohistoquímicos a valorar son el oncogén HER2-neu y el índice Ki67. A continuación, en las gráficas que componen la Figura 21 y 22, se expone la distribución de los casos que componen la muestra del estudio con respecto a los resultados de la positividad de los marcadores anteriormente enunciados.



**Figura 21.** Distribución de las pacientes recogidas en el estudio en relación a la positividad del oncogén HER2-neu del cáncer de mama que padecen, expresados en porcentaje con respecto al total de muestras de dicho gen. n: tamaño muestral.



**Figura 22.** Número de casos en valor absoluto correspondientes a cada grupo de positividad del índice Ki67. n: tamaño muestral.

Las pacientes sometidas a la técnica RT-PCR convencional para el estudio del ganglio centinela son 99, de las cuales un 25,5% presentan diagnóstico de micrometástasis en alguno de sus ganglios extraídos. A su vez, se realizó la RT-PCR a tiempo real a 57 pacientes, fueron positivos los resultados intraoperatorios para malignidad en un 15,8% de los casos. Todas las pacientes con diagnóstico de micrometástasis en la RT-PCR manual presentan un resultado positivo en la técnica a tiempo real (Tabla 13).

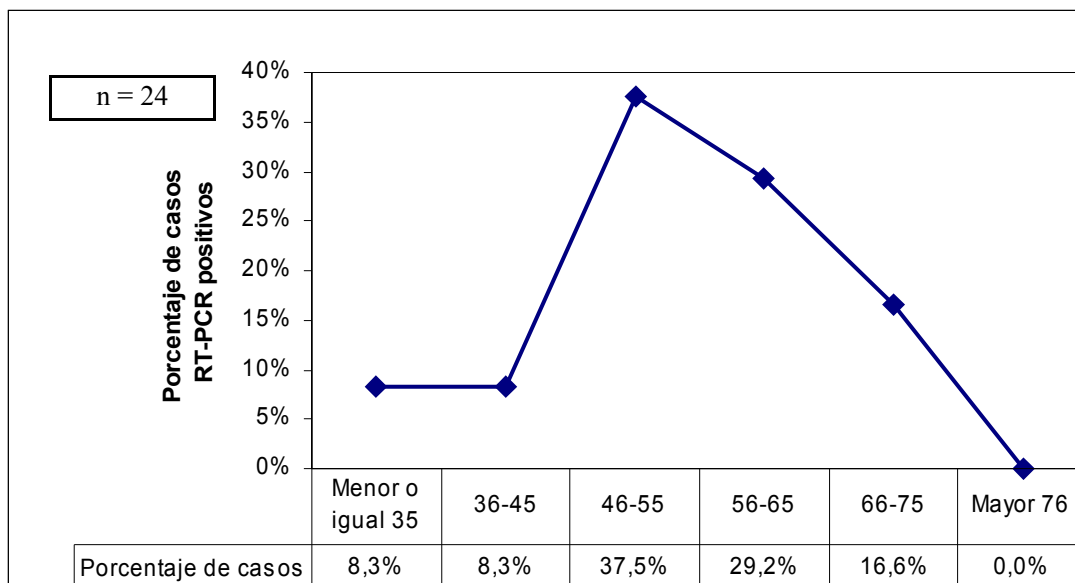
**Tabla 13.** Número de casos en valor absoluto y porcentaje en función del resultado de RT-PCR a tiempo real y manual. RT-PCR: Técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa a tiempo real.

**RT-PCR manual**

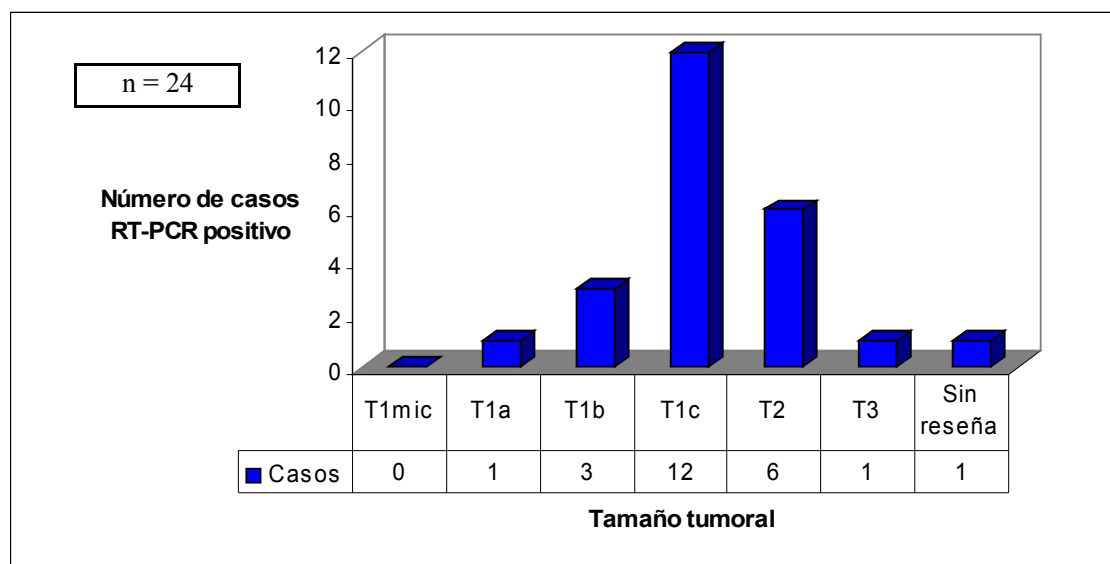
	<b>Negativa</b>	<b>Positiva</b>	<b>Total</b>
RT-PCR a tiempo real negativa	78 (89,6%)	0	78 (100%)
RT-PCR a tiempo real positiva	0	9 (10,3%)	9 (100%)
<b>Total</b>	78 (89,6%)	9 (10,3%)	87 (100%)

Tamaño muestral, n = 87.

Los resultados de la RT-PCR se encuentran asociados a variables descriptivas, como la edad de la paciente y el tamaño tumoral. La distribución de la población según las edades de aparición del tumor mamario con respecto a la positividad de la técnica RT-PCR, se expresan en la Figura 23, siendo 24 el número de casos positivos para micrometástasis por RT-PCR. La Figura 24 muestra el número de pacientes con diagnóstico positivo a RT-PCR en función del tamaño tumoral, según la clasificación TNM.



**Figura 23.** Distribución etaria de los porcentajes de casos positivos para detección de micrometástasis por RT-PCR. n: tamaño muestral.



**Figura 24.** Número de casos con diagnóstico de micrometástasis por RT-PCR según el tamaño del tumor, en función de la clasificación TNM.

A nivel de los parámetros inmunohistoquímicos, es importante establecer la relación de los mismos con los resultados de la RT-PCR del ganglio centinela. En el caso de los receptores hormonales, el 100% de las pacientes con diagnóstico de micrometástasis por RT-PCR (24 pacientes) presentan unos valores por encima del 50% para receptores de estrógeno y progesterona. Por el contrario, este porcentaje desciende al 41,6% en el caso del oncogén Her-2neu positivo.

El estudio de la distribución de los fenotipos tumorales con respecto a los dos parámetros realizados en la muestra del ganglio centinela, Hematoxilina-Eosina y RT-PCR, en todos los casos de la muestra, se realiza para valorar de manera descriptiva los resultados del diagnóstico de micrometástasis (Tabla 14). Un 13,1% de las pacientes presentaron un resultado negativo para Hematoxilina-Eosina, siendo positivo para RT-PCR, de los cuales 2 casos presentaron resultado positivo en el segundo ganglio centinela tanto por Hematoxilina-Eosina, como por RT-PCR. Por otro lado, 2 pacientes con diagnóstico de micrometástasis en el primer ganglio centinela por los dos métodos, también presentaron resultado positivo en la RT-PCR del segundo ganglio extraído.

**Tabla 14.** Distribución del número de casos en función del diagnóstico por Hematoxilina-Eosina y RT-PCR del primer ganglio centinela. 1°GC: Primer ganglio centinela. HE: Hematoxilina-Eosina. RT-PCR: Técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa.

Fenotipo 1° GC	Porcentaje	Nº casos
HE (+) RT-PCR (+)	9,1%	9
HE (-) RT-PCR (+)	13,1%	13
HE (+) RT-PCR (-)	7%	7
HE (-) RT-PCR (-)	70,7%	70
<b>Total</b>	<b>99,9%%</b>	<b>99</b>

Tamaño muestral, n = 99.

El seguimiento de las pacientes en los 40 meses del estudio permite valorar el número de recidivas existentes en la muestra. Se objetivan 11 casos de metástasis tumoral que se distribuyen en local (1 caso), regional (2 pacientes) o sistémica (8 mujeres) en función de la localización de la misma. Durante el seguimiento del estudio se produjo el éxitus de dos pacientes. Un 45,5% de los casos de recidiva obtuvieron un diagnóstico de micrometástasis mediante la técnica RT-PCR, según se muestra en la Tabla 15. En 4 pacientes con recidiva tumoral el diagnóstico con hematoxilina-eosina intraoperatorio fue negativo para malignidad, mientras que sí se diagnosticaron las micrometástasis mediante RT-PCR.

**Tabla 15.** Distribución del número de casos de recidiva tumoral en función del diagnóstico por Hematoxilina-Eosina y RT-PCR del primer ganglio centinela. 1°GC: Primer ganglio centinela. HE: Hematoxilina-Eosina. RT-PCR: Técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa.

<b>Fenotipo 1° GC en casos de recidiva</b>	<b>Porcentaje</b>	<b>N° casos</b>
HE (+) RT-PCR (+)	9,1%	1
HE (-) RT-PCR (+)	36,4%	4
HE (+) RT-PCR (-)	9,1%	1
HE (-) RT-PCR (-)	45,4%	5
<b>Total</b>	<b>100%</b>	<b>11</b>

Tamaño muestral, n = 11.

## **II. ESTUDIO ANALÍTICO DE LOS FACTORES PRONÓSTICO**

Los factores pronóstico en el cáncer de mama a tener en cuenta son los resultados inmunohistoquímicos de la pieza quirúrgica y la valoración de la afectación o no axilar, mediante la biopsia intraoperatoria del ganglio centinela y la RT-PCR. En el estudio, se objetiva que el 88,9% de las pacientes del mismo no presentaron recidiva durante el seguimiento realizado y un 11,1% de las mujeres sí presentaron recidiva tumoral.

### *II.1. RELACIÓN DE LOS FACTORES PRONÓSTICO CONOCIDOS CON LOS RESULTADOS DE LA RT-PCR*

Los resultados inmunohistoquímicos de la pieza tumoral se consideran factores pronósticos del cáncer de mama. Por consiguiente, presenta una gran importancia el estudio analítico de la influencia de los mismos en relación con la RT-PCR. En cuanto a los receptores hormonales, la relación presenta un nivel de significación de 0,060.

En aquellos casos donde el resultado de la RT-PCR resultó positivo (24 pacientes), hubo un caso con valores de receptores hormonales inferiores a 50%, en contraposición con el 62,5% (15 casos) con cifras de dichos receptores superiores al 50%. En segundo lugar, cabe destacar, que el 68% (51 casos) de las pacientes con resultado negativo para RT-PCR obtuvieron cifras de receptores hormonales superiores al 50%. Tabla 16.

**Tabla 16.** Test estadístico, Chi-cuadrado, entre los resultados de la prueba RT-PCR y los valores de receptores hormonales a nivel tumoral. RT-PCR: Técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa.

#### RECEPTORES HORMONALES

	<25%	25-50%	>50%	Total
RT-PCR negativa	13 (17,3%)	11 (14,7%)	51 (68%)	75 (100%)
RT-PCR positiva	1 (4,2%)	8 (33,3%)	15 (62,5%)	24 (100%)
<b>Total</b>	14 (14,1%)	19 (19,2%)	66 (66,7%)	99 (100%)

Nivel de significación, **p = 0,060**. Tamaño muestral, n = 99.

El siguiente factor pronóstico cuya comparación debe establecerse con la RT-PCR, es el oncogén HER2-neu. Sólo un 15,3% (11 casos) del total de pacientes con resultado negativo en la RT-PCR obtuvieron un valor de tres cruces (3+++)<sup>1</sup> del oncogén HER2-neu, a diferencia del 52,2% (12 casos) de mujeres con positividad en la prueba que no sobreexpresaron dicho oncogén (Tabla 17). Esta relación se establece mediante un estudio estadístico, Chi-cuadrado, careciendo de significación estadística (p = 0,620).

**Tabla 17.** Estudio Chi-cuadrado de la relación de los resultados de RT-PCR y la sobreexpresión del oncogén HER2-neu. RT-PCR: Técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa.

#### ONCOGÉN HER2-neu

	Negativo	2(++)	3(+++)	Total
RT-PCR negativa	39 (54,2%)	22 (30,6%)	11 (15,3%)	72 (100%)
RT-PCR positiva	12 (52,2%)	9 (39,1%)	2 (8,7%)	23 (100%)
<b>Total</b>	51 (53,7%)	31 (32,6%)	13 (13,7%)	95 (100%)

Nivel de significación, **p = 0,620**. Tamaño muestral, n = 95.

El último receptor inmunohistoquímico considerado como factor pronóstico, estudiado en la pieza tumoral, es el índice Ki67. Para establecer el valor pronóstico de la RT-PCR comparándolo con el mismo de dicho índice se establece un análisis estadístico, siendo la relación estadística no significativa ( $p = 0,941$ ), Tabla 18.

**Tabla 18.** Comparación estadística del resultado de RT-PCR y el índice Ki67. RT-PCR: Técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa a tiempo real.

#### ÍNDICE Ki67

	<25%	25-50%	>50%	Total
RT-PCR negativa	63 (87,5%)	5 (6,9%)	4 (5,6%)	72 (100%)
RT-PCR positiva	20 (87%)	2 (8,7%)	1 (4,3%)	23 (100%)
<b>Total</b>	83 (87,4%)	7 (7,4%)	5 (5,3%)	95 (100%)

Nivel de significación, **p = 0,941**. Tamaño muestral, n = 95.

Todos los resultados anteriormente descritos se han analizado tras la comparación de los factores pronóstico con la RT-PCR convencional, pudiéndose extrapolar los mismos a la técnica a tiempo real, puesto que en el estudio descriptivo, se ha observado que todos los resultados positivos y negativos para micrometástasis mediante RT-PCR a tiempo real obtienen el mismo valor en la técnica convencional (Tabla 13).

## II.2. RELACIÓN DE LOS FACTORES PRONÓSTICO CON LA VARIABLE RECIDIVA

En primer lugar, se valora la repercusión de los receptores hormonales en la probabilidad de recidiva tumoral, observándose que el 36,4% de las pacientes que presentaron cuadros de metástasis durante los cuatro años de seguimiento tuvieron valores inferiores al 50% para dichos receptores en el tumor, frente al 63,6% de los casos con recidiva que presentaron cifras de receptores hormonales en número mayor al 50% ( $p = 0,920$ ), Tabla 19.

Esta relación, entre la positividad de la pieza anatomopatológica a receptores hormonales con la presencia de recidiva tumoral, se convierte en estadísticamente significativa ( $p = 0,01$ ) si la agrupación de los receptores hormonales siguiese una distribución diferente, bien sea, valores inferiores al 50% y superiores al 50%, Tabla 20.

**Tabla 19.** Estudio Chi-cuadrado de la relación de los receptores hormonales y la existencia de recidiva tumoral.

### RECEPTORES HORMONALES

	<25%	25-50%	>50%	Total
Ausencia recidiva	12 (13,6%)	17 (19,3%)	59 (67%)	88 (100%)
Presencia recidiva	2 (18,2%)	2 (18,2%)	7 (63,6%)	11 (100%)
<b>Total</b>	14 (14,1%)	19 (19,2%)	66 (66,7%)	99 (100%)

Nivel de significación,  $p = 0,920$ . Tamaño muestral,  $n = 99$ .

**Tabla 20.** Estudio Chi-cuadrado de la relación de la positividad a los receptores hormonales y la presencia o no de recidiva tumoral.

**RECEPTORES HORMONALES**

	$\leq 50\%$	$> 50\%$	<b>Total</b>
Ausencia recidiva	29 (32,9%)	59 (67%)	88 (100%)
Presencia recidiva	4 (36,4%)	7 (63,6%)	11 (100%)
<b>Total</b>	33 (33,3%)	66 (66,7%)	99 (100%)

Nivel de significación,  $p = 0,01$ . Tamaño muestral,  $n = 99$ .

A continuación, en el estudio analítico, se objetiva que la relación estadística entre el oncogén HER2-neu y la probabilidad de desarrollar metástasis tumoral a lo largo del seguimiento de las pacientes oncológicas no es significativo ( $p = 0,637$ ). Por el contrario, sí es posible observar que el 55,3% (47 casos) de las pacientes que no presentaron recidiva obtuvieron un resultados negativo para el oncogén. A su vez, el 20% (2 casos) de las mujeres con metástasis obtuvieron valores de HER2-neu positivo por inmunohistoquímica. Tabla 21.

**Tabla 21.** Relación estadística, mediante estudio de Chi-cuadrado, entre recidiva tumoral y presencia de oncogén HER2-neu.

#### ONCOGÉN HER2-neu

	Ausencia	2(++)	3(+++)	Total
Ausencia recidiva	47 (55,3%)	27 (31,8%)	11 (12,9%)	85 (100%)
Presencia recidiva	4 (40%)	4 (40%)	2 (20%)	10 (100%)
Total	51 (53,7%)	31 (32,6%)	13 (13,7%)	95 (100%)

Nivel de significación,  $p = 0,637$ . Tamaño muestral,  $n = 95$ .

Los resultados del índice Ki67 no presentan una relación estadísticamente significativa con el riesgo de metástasis local, regional o sistémica ( $p = 0,802$ ). Sin embargo, el 81,8% (9 casos) de las pacientes con recidiva tumoral presentaron un valor menor a 25% en el índice Ki67, en contraposición al 9,1% (1 caso) de mujeres con valores superiores a 50% en dicho índice, Tabla 22.

**Tabla 22.** Estudio Chi-cuadrado del índice Ki67 y la presencia de metástasis tumoral durante el seguimiento.

#### ÍNDICE Ki67

	<25%	25-50%	>50%	Total
Ausencia recidiva	74 (88,1%)	6 (7,1%)	4 (4,8%)	84 (100%)
Presencia recidiva	9 (81,8%)	1 (9,1%)	1 (9,1%)	11 (100%)
Total	83 (87,4%)	7 (7,4%)	5 (5,3%)	95 (100%)

Nivel de significación,  $p = 0,802$ . Tamaño muestral,  $n = 95$ .

### III. VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA RT-PCR

Para establecer la correcta validación de la RT-PCR a tiempo real es imprescindible la valoración de la relación estadística de sus resultados con la prueba gold-standard en la determinación de la afectación o no tumoral del ganglio centinela. Dicha prueba, en el momento actual, es el análisis anatomopatológico del tejido extraído en la intervención del ganglio centinela. Si se realiza un estudio Chi-cuadrado de esta relación, se objetiva que es estadísticamente significativa, con un nivel de significación de 0,000 ( $p < 0,001$ ), Tabla 23.

**Tabla 23.** Test estadístico, Chi-cuadrado, entre los resultados de la prueba RT-PCR y el resultado anatomopatológico del ganglio centinela. RT-PCR: Técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa. AP DEFINITIVA GC: Resultado anatomopatológico definitivo del ganglio centinela.

#### AP DEFINITIVA GC

	Negativo	Positivo	Total
RT-PCR negativa	68 (90,7%)	7 (9,3%)	75 (100%)
RT-PCR positiva	10 (41,7%)	14 (58,3%)	24 (100%)
Total	78 (78,8%)	21 (21,2%)	99 (100%)

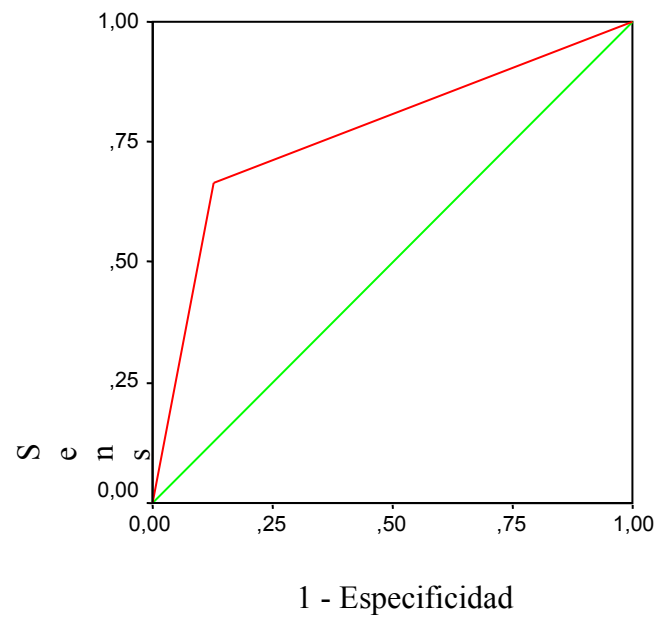
Nivel de significación,  $p < 0,001$ . Tamaño muestral,  $n = 99$ .

Basándose en la tabla de contingencia anteriormente expuesta, se puede establecer la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo de la prueba a estudio, la RT-PCR. La sensibilidad, considerada como la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo cuyo estado real sea el definido como positivo respecto a

la condición que estudia la prueba, razón por la que también es denominada fracción de verdaderos positivos, resulta, en el estudio, de 66,6%, mientras que la especificidad de la prueba (probabilidad de clasificar correctamente a un individuo cuyo estado real sea el definido como negativo) es de un 87,2%. La tasa de valor predictivo positivo, considerado como los verdaderos positivos entre los resultados positivos de la prueba, presenta un valor de 58,3%. Por último la proporción de los verdaderos negativos con respecto a los resultados negativos de la RT-PCR, es el valor predictivo negativo, que consigue un porcentaje de 90,6%.

Aunque la sensibilidad, la especificidad y los valores predictivos han sido empleados durante un largo periodo de tiempo como indicadores de la agudeza diagnóstica de una prueba, existen otros métodos más modernos, como las curvas ROC, que se consideran de mayor consistencia como indicadores. El área bajo la curva ROC es el mejor indicador global de la precisión de una prueba diagnóstica. En el estudio, la curva ROC de la RT-PCR se encuentra representada en la Figura 25.

Los parámetros resultantes del área bajo la curva ROC es 0,769, con un error estándar de 0,65, un nivel de significación  $p < 0,001$  y un intervalo de confianza del 95% (0,641-0,897).



Área	Desviación estándar	Nivel de significación	IC 95%
0,769	0,065	0,000	0,641-0,897

Tamaño muestral, n = 99.

**Figura 25.** Gráfica de la curva ROC. Evaluación de la RT-PCR del ganglio centinela en el cáncer de mama.

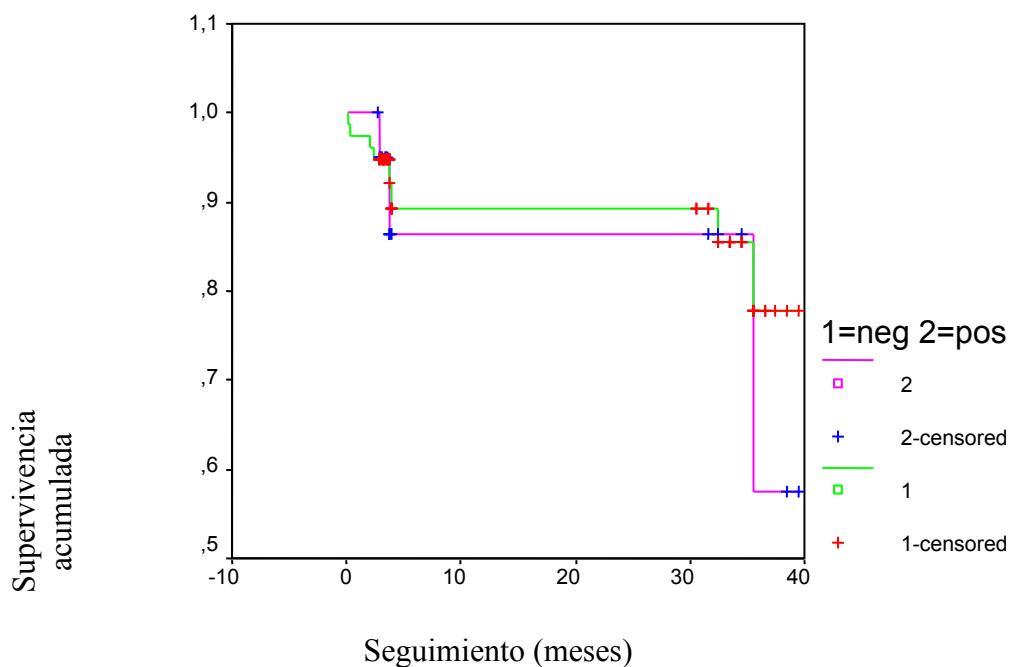
#### **IV. ESTUDIO DE SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD**

En el estudio se realiza el control de la evolución de las 99 pacientes con un seguimiento mediano de 34 meses con un rango de 29 a 40 meses.

##### *IV.1. ESTUDIO DE SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD EN FUNCIÓN DEL RESULTADO MEDIANTE HEMATOXILINA-EOSINA DEL GANGLIO CENTINELA*

Se realiza la valoración de la recidiva tumoral de las pacientes a estudio, durante el periodo de seguimiento, en función del resultado positivo o negativo de malignidad del ganglio centinela mediante la tinción de Hematoxilina-Eosina. Dicha comparación entre las curvas de ambos resultados se realiza mediante la aplicación de la prueba de logaritmo del rango (“Log Rank”), Figura 26.

El riesgo de recidiva de las pacientes con resultado negativo o positivo para malignidad del ganglio centinela mediante Hematoxilina-Eosina no muestra diferencias estadísticamente significativas, tras la comparación de las dos curvas de supervivencia mediante el test de “Log Rank” ( $p = 0,620$ ).

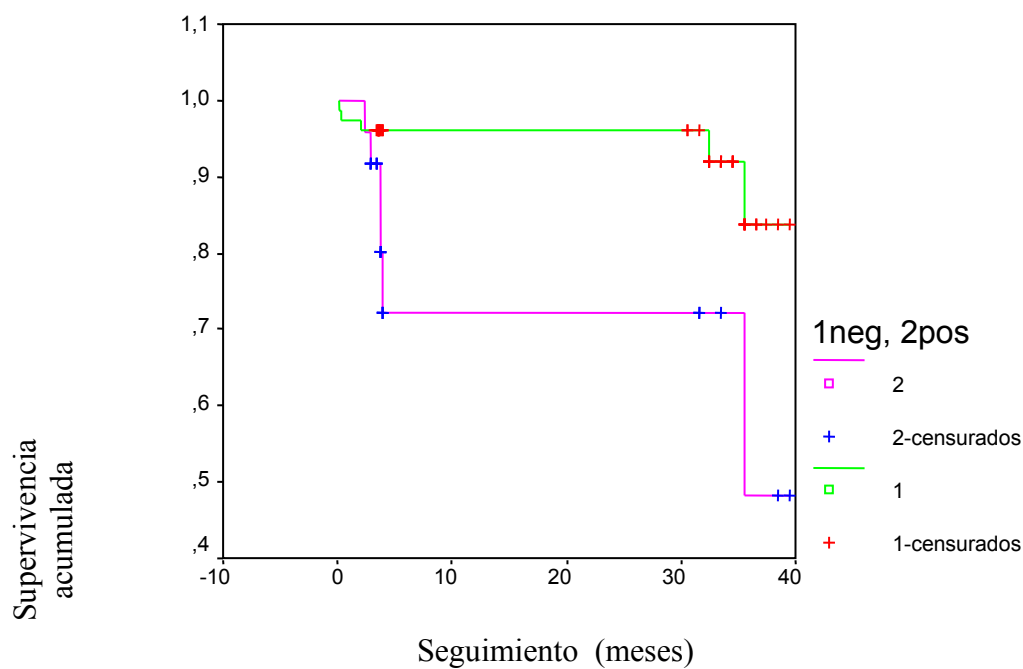


Nivel de significación,  $p = 0,620$

**Figura 26.** Comparación de curvas de supervivencia empleando el método de Kaplan-Meier, donde se valora la evolución hacia la recidiva tumoral de las pacientes con resultado positivo o negativo en el ganglio centinela mediante Hematoxilina-Eosina. 1neg: resultado negativo para malignidad con tinción de Hematoxilina-Eosina del ganglio centinela. 2 pos: resultado positivo para malignidad con tinción de Hematoxilina-Eosina del ganglio centinela. p: nivel de significación.

IV. 2. ESTUDIO DE SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD EN FUNCIÓN  
DEL RESULTADO MEDIANTE RT-PCR DEL GANGLIO CENTINELA

Para establecer el comportamiento temporal del cáncer de mama con respecto al resultado obtenido en la RT-PCR a tiempo real se realiza la comparación de las curvas de supervivencia por el método de Kaplan-Meier, representada en la Figura 27.



Nivel de significación,  $p = 0,021$

**Figura 27.** Comparación de curvas de supervivencia empleando el método de Kaplan-Meier, donde se valora la evolución hacia la recidiva tumoral de las pacientes con resultado positivo o negativo en la RT-PCR a tiempo real. 1neg: resultado negativo para malignidad con técnica RT-PCR a tiempo real. 2 pos: resultado positivo para malignidad con técnica RT-PCR a tiempo real. p: nivel de significación.

La supervivencia de las pacientes con resultado negativo para malignidad del ganglio centinela en la RT-PCR es mejor que aquellas que obtuvieron un dato positivo en dicha prueba, tras la comparación de las dos curvas de supervivencia mediante el test de logaritmo del rango (“Log Rank”), siendo estadísticamente significativo ( $p = 0,021$ ).

A los 40 meses, la supervivencia libre de enfermedad, en el grupo clasificado por ser negativa la RT-PCR a tiempo real es de 37,3 meses (intervalo de confianza, IC, del 95%, 35.5-39.2). Dicho supervivencia desciende a 28,5 meses (IC 95%, 20.8-36.2) en el grupo con resultados positivo para malignidad mediante RT-PCR.

## **DISCUSIÓN**

El cáncer de mama es una enfermedad sistémica que genera una gran problemática sanitaria, social y económica, puesto que es la neoplasia diagnosticada con más frecuencia en las mujeres occidentales. En la distribución etaria, de dicha enfermedad, en el estudio, se pueden observar dos subgrupos que presentan la máxima frecuencia. Los grupos descritos previamente son entre los 45-55 años (25% de pacientes) y entre los 65-75 años (24% de las mujeres de la muestra). Esta organización bimodal de la incidencia del cáncer de mama ya ha sido descrita por otros autores, como es el caso de Jatoi I. y cols.<sup>54</sup>, en cuyo artículo se definen dos tipos de cáncer de mama en relación con la edad, debido fundamentalmente a las diferentes características tumorales. En esta publicación se afirma que la máxima frecuencia de la neoplasia mamaria, se produce en dos picos; el primero de ellos a los 50 años, siendo tumores altamente agresivos y, el segundo grupo, a los 70 años, con cánceres de bajo riesgo. Los estudios moleculares permiten proveer de mayor conocimiento, en cuanto a la diferenciación de las células tumorales, en estos dos subtipos de cáncer de mama.

Los antecedentes familiares de la paciente es un dato de gran importancia a la hora de realizar la anamnesis de la historia clínica, debido, fundamentalmente, a que aquellas mujeres con casos de cáncer de mama en familiares de primer y segundo grado tienen un riesgo incrementado de padecer dicha enfermedad. En estudios realizados en centros con datos de tumores hereditarios se ha observado que el 73% de los mismos se regía por un patrón genético, mientras que el 26% se debía a factores ambientales<sup>55</sup>. En la muestra del trabajo, se describe que un 28% de las pacientes presentaban antecedentes familiares oncológicos, siendo un 15% de origen mamario, y 11% restante de otra estirpe, bien sea colon, ovario y melanoma.

En cuanto a los antecedentes personales de las pacientes objeto de estudio, la mayoría de ellas (75 casos) no presentó ningún dato de interés, en contraposición con 4 casos de patología oncológica previa y 20 casos de lesiones mamarias. El riesgo relativo (RR) de cáncer de mama en función de la lesión precursora se expone en la siguiente tabla (Tabla 24)<sup>3</sup>.

**Tabla 24.** Riesgo relativo de cáncer de mama en función de la lesión precursora.

Riesgo Relativo	Lesión precursora
1	Adenosis no esclerosante, ectasia ductal, fibroadenoma simple, fibrosis, mastitis, macromastitis gestacional, quistes, hiperplasia leve sin atipias, metaplasia apocrina simple, metaplasia escamosa.
1-2	Fibroadenoma complejo, hiperplasia moderada o grave sin atipia, adenosis esclerosante, papiloma solitario sin atipia.
4-5	Hiperplasia ductal atípica. Hiperplasia lobulillar atípica.
8-10	Carcinoma ductal in situ. Carcinoma lobulillar in situ.

En el estudio, las lesiones precursoras que se observaron fueron: un caso de tumor Phyllodes (RR: 1-2), tres pacientes con intervenciones por fibroadenomas (RR: 1), cuatro mujeres con cuadros de mastitis previos (RR: 1), antecedentes de mastopatía fibroquística en cinco procesos (RR: 1), un quiste mamario (RR: 1), tres casos con lesiones precancerosas (carcinoma ductal in situ con un RR: 8-10, enfermedad de Paget e hiperplasia ductal atípica, siendo su RR: 4-5) y tres pacientes con antecedente de patología oncológica en la mama contralateral.

Las guías internacionales recomiendan el uso de la ultrasonografía mamaria como un examen complementario pero no como un método de cribado del cáncer de mama. Por el contrario, la mamografía es el método elegido para el screening poblacional, habiéndose observado que el 35-45% de tumores no palpables son diagnosticados como microcalcificaciones en dicha prueba. Mas, la mamografía posee un punto débil, todas aquellas pacientes con tejido mamario de alta densidad presentan un elevado riesgo de cáncer de mama por su dificultad para ser diagnosticado por el método de cribado común. Estos casos se beneficiarían de la realización de una ecografía complementaria, permitiendo el diagnóstico de cánceres invasivos ocultos a la mamografía<sup>56</sup>. La realización simultánea, en el cribado de la mama, de ecografía y mamografía incrementaría la detección precoz de tumores, pero también aumentaría la tasa de falsos positivos, por consiguiente, el número de pruebas invasivas hasta alcanzar el diagnóstico de certeza<sup>57</sup>. Los resultados del estudio demuestran que al 93,9% (93 casos) de las pacientes se les realizó estudio mamográfico y sólo hubo 10 mujeres donde no se estimó la realización de prueba ultrasonográfica. Por consiguiente, el estudio por imagen de las pacientes de la muestra se realizó de forma satisfactoria.

En el momento actual, se abren nuevas vertientes que permiten otra manera de enfocar el estudio de la mama, como son la resonancia magnética nuclear (RM) y/o la tomografía con emisión de positrones (PET). Existen escuelas que afirman que la RM preoperatoria permite enfocar de una forma más concreta y segura el tipo de tratamiento quirúrgico de la paciente, en contraposición cabría la posibilidad de plantearse el grado de incertidumbre, en el momento del diagnóstico, que se genera en la mujer y el número

de cirugías más radicales que se van a realizar en los casos donde se indica dicha prueba, con la consecuente morbilidad y disminución de calidad de vida<sup>58</sup>. En el estudio, treinta y dos pacientes fueron sometidas a una prueba complementaria de RM, de manera independiente al test diagnóstico inicial, bien fuera ecográfico o mamográfico.

Otra prueba diagnóstica que se incluye para la estadificación tumoral, no sólo del cáncer de mama, sino también de otras neoplasias bien sean de localización gastrointestinal, de cuello o cabeza, melanomas o linfomas malignos, es la PET<sup>59,60</sup>. La PET permite conocer la localización y la monitorización tumoral. En la muestra estudiada, en dos casos se realizó PET para establecer un adecuado estudio oncológico. En el momento actual se está empleando de manera más extendida y principalmente para la valoración del seguimiento de las pacientes con patología tumoral.

El objetivo de tener un diagnóstico preoperatorio más fidedigno y certero es, con el fin, de realizar cirugías cada vez menos agresivas y, de este modo, disminuir la morbilidad tan elevada que genera los tratamientos radicales en la mama.

En el trabajo se consiguió realizar cirugía conservadora en el 75,7% de las pacientes (siendo el tamaño muestral de 99 mujeres), y sólo se trató con intervenciones radicales al 24,2%. Estos resultados son datos muy satisfactorios a la hora de valorar el índice de morbilidad de las pacientes del centro a estudio. Por otra parte, en todos los casos se realizó la técnica de biopsia intraoperatoria de ganglio centinela, llevándose a cabo, a continuación, linfadenectomía axilar en un 23,2% (23 casos).

En la Figura 19 se representa la distribución de los resultados del estudio anatomopatológico de lesiones mamarias y el método empleado para conseguir dichos valores. Se objetiva que un 17,3% de las pacientes no se realizó estudio ni citológico ni histológico con P.A.A.F. ni B.A.G., respectivamente, debido a que dichos casos presentaban una resonancia magnética que informaba de malignidad o bien, son pacientes con biopsias diferidas previas, no habiéndose observando, en el estudio, alteraciones en la migración del radiotrazador, en pacientes con cirugía previa.

La biopsia selectiva del ganglio centinela es una técnica diagnóstica multidisciplinar, precisa de la colaboración de diferentes especialidades médicas y quirúrgicas. Tradicionalmente, ha sido precisa una validación técnica de dicha técnica tanto a nivel del equipo como de cada uno de los especialistas implicados. Esta validación es aconsejable que sea sustituida por un proceso de aprendizaje supervisado en el contexto de un grupo con experiencia, según la Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria<sup>18</sup>. Este aprendizaje debería llevarse a cabo con grupos que hayan realizado más de 300 casos de biopsia selectiva de ganglio centinela en fase de aplicación clínica (con parámetros de validación definidos en los consensos previos: al menos un 95% de tasa de identificación del o los ganglios centinelas, con una tasa falsos negativos del 5% o menos). El objetivo de este aprendizaje tutelado debe alcanzar unos estándares en indicadores de calidad relacionados con el procedimiento.

La biopsia selectiva del ganglio centinela es una técnica, que tras una curva de aprendizaje adecuada, que permite la idónea identificación de la primera estación linfática donde se produce el drenaje de todo el territorio mamario. La realización de la

misma ha ido variando a lo largo del tiempo, claro ejemplo es la localización de la inyección del radiotrazador para su mejor migración al territorio linfático. En este campo existen dos posibilidades ampliamente extendidas, la administración peritumoral o bien la intradérmica periareolar. Los diferentes trabajos realizados permiten demostrar que se obtienen los mejores resultados de dicha migración en los casos de inyección periareolar intradérmica del radiotrazador, siendo, su empleo de manera aislada, un método efectivo para la estadificación axilar<sup>26,61</sup>. En el estudio expuesto, la biopsia selectiva del ganglio centinela en los casos de cáncer de mama se comienza con la administración periareolar intradérmica del radiocoloide.

El procedimiento de la biopsia intraoperatoria del ganglio centinela se considera una alternativa a la linfadenectomía axilar convencional, gracias a una adecuada estadificación axilar y disminución, en gran medida, de la morbilidad de las pacientes. El problema de mayor importancia es cómo determinar las metástasis en el ganglio centinela de forma rápida y en el mismo acto quirúrgico. El adecuado diagnóstico de dichas metástasis permitiría reducir segundas intervenciones en pacientes con ganglios centinelas positivos que fueron falsos negativos en el primer tiempo.

El primer método de estudio intraoperatorio del ganglio centinela fue mediante citología. Los resultados de esta técnica varían en función del grado de sección del ganglio a estudio y de la técnica empleada para la realización de la citología (Hematoxilina-Eosina, Papanicolaou, Giemsa), sin olvidar que es una prueba operador-dependiente. Por consiguiente, la sensibilidad de la citología para la detección de metástasis a nivel del ganglio centinela se va encontrar modificada en función de la

tinción utilizada para su realización, por tanto, en el caso del empleo de Giemsa, la sensibilidad varía de 33% a 81,1%<sup>62,63</sup>, con el Papanicolaou de 62% a 91%<sup>64,65,66</sup>, mientras que con la Hematoxilina-Eosina el intervalo de sensibilidad se encuentra entre un 41% a 96%<sup>67</sup>. La sensibilidad de la citología con Giemsa puede ser inferior que si se utiliza la tinción de Papanicolaou o Hematoxilina-Eosina, especialmente para la detección de micrometástasis, considerado el gran problema de la citología intraoperatoria.

En el año 2009, Fujishima M. y cols.<sup>68</sup> presentaron una comparación entre el estudio citológico intraoperatorio mediante tinción de Papanicolaou y su asociación con técnica de inmunohistoquímica. Se observa una variación de los valores de sensibilidad importantes. Mientras que el porcentaje de sensibilidad con la preparación de Papanicolaou exclusivamente es de 30%, puede ascender hasta un 79% si se asocia el otro método. La especificidad es similar en ambos casos con cifras elevadas (99% si se tiñe el corte sólo con Papanicolaou, 98% si se añade inmunohistoquímica).

El intento de mejorar el diagnóstico de metástasis en el ganglio centinela de manera intraoperatoria lleva consigo el gran auge de estudios recientes sobre dicho tema. En Londres, Hamidian Jahromi A. y cols, realizan un estudio prospectivo en 74 pacientes con 146 ganglios. Se realiza citología con Hematoxilina-Eosina intraoperatoria en todos los casos, alcanzándose una sensibilidad de 60% y una especificidad de 99,2%<sup>69</sup> en la detección de metástasis en el ganglio a estudio. En otro trabajo reciente, publicado en el año 2010, donde se compara la citología intraoperatoria del ganglio centinela en dos unidades mamarias de hospitales del Reino Unido, alcanzando un tamaño muestral de

166 pacientes, se observa como la sensibilidad de dicha prueba es de 61,7%, mejorando la misma a medida que se realizan secciones para estudio más pequeñas y si se emplean métodos de inmunohistoquímica ultrarrápida<sup>70</sup>.

Para intentar establecer una resolución y alcanzar un adecuado diagnóstico de las micrometástasis en el ganglio centinela del cáncer de mama y, de este modo, mejorar la calidad de vida y la supervivencia libre de enfermedad de las pacientes, se ha introducido la RT-PCR en el ámbito intraoperatorio. El manejo molecular mediante PCR intraoperatorio permite minimizar y estandarizar la evaluación histológica del ganglio centinela, evitando la dependencia inter e intraobservador del estudio citológico intraoperatorio. Tafe L.J. y cols.<sup>71</sup>, presenta un artículo basado en el estudio de la expresión del RNA empleando como marcadores génicos: mamoglobina, citoqueratina 19 y porfobilinógeno desaminasa. En dicho estudio recogen un tamaño muestral de 59 pacientes, obteniendo una sensibilidad para la RT-PCR de 88,9% y una especificidad de 93,5%.

En el año 2008, se publicó un artículo de Julian T.B. y cols.<sup>72</sup>, presentando un modelo de test molecular para el estudio intraoperatorio de ganglios centinelas de pacientes con cáncer de mama precoz. La validación de la técnica permitió extrapolar el valor de sensibilidad de un 87,6% y de especificidad de un 94,2% para dicha técnica.

En el trabajo expuesto, se alcanzan cifras de sensibilidad de 66,6% y especificidad de 87,2%, con un tamaño muestral de 99 pacientes y 180 ganglios, empleándose de igual manera que en la publicación anterior, la RT-PCR convencional, pudiéndose extrapolar

los datos a la RT-PCR intraoperatoria con marcadores génicos de mamoglobina, citoqueratina 19 y porfobilinógeno desaminasa, puesto que los resultados de las dos técnicas son los mismos en los 87 ganglios en los que se pudo realizar ambos estudios.. La capacidad de detectar un caso de ganglio centinela sin metástasis y que sea realmente un ganglio sano es de un 90,6%.

En Bélgica, Martin Martinez I. y cols.<sup>73</sup>, publicaron un trabajo sobre la comparación de la técnica molecular, RT-PCR, con los estudios histopatológicos (inmunohistoquímica y Hematoxilina-Eosina), para establecer la comparación de la detección de metástasis en el ganglio centinela de forma intraoperatoria. La sensibilidad obtenida fue de un 92% con 97% de especificidad.

Recientemente, la biopsia óptica consigue una amplificación genética más segura y rápida (30 minutos) que la morfología en la detección de metástasis en el ganglio centinela. Este método se denomina técnica de OSNA (One Step Nucleic Acid Amplification), con amplificación isotérmica RT-LAMP (reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification). El método OSNA consiste en la amplificación de genes (citoqueratina 19) a tiempo real del RNA mensajero (mRNA). Para determinar la sensibilidad y especificidad de OSNA basado en la expresión del mRNA de la citoqueratina 19, se compara con el estudio histológico, obteniendo como resultados valores de sensibilidad entre 87,5-98,1% y especificidad de 90,8-94,3%<sup>74,75,76</sup>.

A continuación se muestra en la Tabla 25 la comparativa de los valores de sensibilidad y especificidad de la biopsia intraoperatoria del ganglio centinela en el cáncer de mama, en función de la técnica empleada en su estudio.

**Tabla 25.** Comparativa de la sensibilidad y especificidad de las diferentes técnicas de realización de la biopsia intraoperatoria del ganglio centinela. Pap: Papanicolaou. HE: Hematoxilina-Eosina. RT-PCR: Técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa a tiempo real. OSNA: One Step Nucleic Acid Amplification. H.C.S.C.: Hospital Clínico San Carlos.

Autor	Año	Nº casos	Método	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
Barranger y cols. <sup>62</sup>	2004	185	Giemsa	33%	98%
Chicken y cols. <sup>63</sup>	2006	235	Giemsa	81,1%	100%
Nagashima y cols. <sup>64</sup>	2003	124	Pap	62%	99%
Motomura y cols. <sup>65</sup>	2000	101	Pap	91%	99%
Motomura y cols. <sup>66</sup>	2008	631	Pap	85%	97%
Fujishima y cols. <sup>68</sup>	2009	85	Pap	30%	99%
		92	IHQ	79%	98%
Rubio y cols. <sup>67</sup>	1998	53	HE	96%	100%
Jahromi y cols. <sup>69</sup>	2009	74	HE	60%	99,2%
Clarke y cols. <sup>70</sup>	2010	166	IHQ	61,7%	—
Tafe y cols. <sup>71</sup>	2010	59	RT-PCR	88,9%	93,5%
Julian y cols. <sup>72</sup>	2008	416	RT-PCR	87,6%	94,2%
Martin Martinez y cols. <sup>73</sup>	2009	78	RT-PCR	92%	97%
Schem y cols. <sup>75</sup>	2009	93	OSNA	98,1%	90,8%
Tamaki y cols. <sup>76</sup>	2009	164	OSNA	87,5%	94,3%
Estudio H.C.S.C	2010	99	RT-PCR	66,6%	87,2%

Cualquier método histológico tiene una serie de limitaciones, debido fundamentalmente a que no existe ninguna técnica que sea la auténtica de elección para establecer la comparación de nuevos procedimientos. Para intentar eliminar la mayoría de sesgos inherentes a estas prácticas se debería realizar el estudio por diferentes patólogos. Con este procedimiento se conseguiría eliminar la subjetividad de los resultados, pero sería de muy difícil realización puesto que no se podrían dar resultados intraoperatorios por varios patólogos por el tiempo quirúrgico de espera y por el tamaño de los fragmentos realizados en el ganglio centinela extraído (dependientes del tamaño inicial del mismo); en segundo lugar, sería preciso realizar un doble análisis de la pieza, central y periférica, para alcanzar un correcto diagnóstico de la misma sobre la negatividad o positividad para malignidad<sup>66,69,72</sup>.

Por consiguiente, los métodos histológicos tienen un rango de sensibilidad que puede variar desde el 55% al 91% en las secciones congeladas y de 30 a 96% en los estudios citológicos, esto hace sospechar que se encuentran en una segunda posición en el diagnóstico intraoperatorio de malignidad de la técnica de la biopsia del ganglio centinela, puesto que la sensibilidad de las técnicas de biología molecular son elevadas sin la gran variabilidad del rango acontecida en los procedimientos anatomopatológicos<sup>73</sup>.

El estudio francés publicado por Barranger E. y cols. presenta un valor de sensibilidad para estudio citológico intraoperatorio con tinción de Giemsa de un 33,3%, siendo relativamente bajo; mientras que la determinación del valor predictivo positivo asciende al 90%<sup>62</sup>, por consiguiente, a la paciente sometida a una linfadenectomía axilar por un

resultado positivo para malignidad en la biopsia del ganglio centinela, se le realiza un tratamiento quirúrgico completo, en el mismo acto operatorio.

Los datos expuestos anteriormente de sensibilidad y especificidad varían con respecto al estudio realizado por Chicken y cols., publicado en el año 2006, donde ascienden a unas cifras de 81,1% y 100%, respectivamente<sup>63</sup>. Estas diferencias pueden encontrarse aumentadas por el mayor número de ganglios centinelas valorados en el trabajo inglés. Otro dato de gran importancia descrito por dicho autor, es la agudeza diagnóstica de la valoración por parte del cirujano al explorar el ganglio centinela, obteniendo una sensibilidad de 64,3% y especificidad de 87,6%. La grandeza de este dato radica en lo elevado de estas cifras, siendo superiores a los datos obtenidos por técnicas más objetivas; por consiguiente, los médicos con elevada experiencia en la realización de la técnica de la biopsia selectiva del ganglio centinela consiguen un diagnóstico correcto de su afectación en un gran número de casos.

Lo que bien es cierto es que estos resultados son alentadores en un principio pero inquietantes tras una segunda observación, puesto que se incrementan las necesidades de diferentes técnicas hasta encontrar la que mejor agudeza diagnóstica posea de manera intraoperatoria.

Motomura y cols.<sup>66</sup> obtienen una sensibilidad y especificidad de un 91% y un 99%, respectivamente, mediante el empleo de la tinción con Papanicolaou de las muestras intraoperatorias del ganglio centinela extraídas durante las intervenciones de las pacientes a estudio. El número medio de ganglios centinelas extraídos en cada

intervención fue de 1.9, siendo un dato muy similar al estudio actual donde en el 53,5% de las pacientes se obtuvieron entre 1 y 2 ganglios.

En dicho trabajo existe un sesgo, debido fundamentalmente a la determinación subjetiva de la afectación o no del ganglio centinela, es decir, los patólogos clasifican el diagnóstico de las muestras como negativas para malignidad, sospechosas o positivas para malignidad. Las muestras sospechosas las incluyen dentro de las negativas para malignidad para disminuir la tasa de falsos positivos. Al realizar la comparación de la tinción con Papanicolaou con el posterior estudio mediante inmunohistoquímica se detectaron 20 casos (4%) de 501 pacientes con diagnóstico de ganglios centinelas negativos para malignidad con células tumorales aisladas. El estudio citológico se beneficia de un mayor número de cortes de la muestra del ganglio centinela, permitiendo un estudio más pormenorizado y una mayor sensibilidad y especificidad de la prueba. Mediante la técnica RT-PCR a tiempo real, empleada en el trabajo expuesto, se llega al diagnóstico de 2 (2%) casos de células tumorales aisladas de 99 pacientes en estudio y de 3 (3%) casos de micrometástasis, todo ello en el propio acto operatorio permitiendo de dicho modo no demorar el tratamiento posterior, la linfadenectomía axilar, a un segundo acto quirúrgico en el caso de las micrometástasis y permitir un tratamiento adyuvante más completo al conocer mejor el estado ganglionar de cada paciente por la presencia de células tumorales aisladas.

En Japón, desde el año 2005 hasta el año 2006, se realizó un trabajo de investigación<sup>68</sup> con el fin de establecer los diferentes parámetros de sensibilidad y especificidad al estudiar los cortes de la biopsia intraoperatoria del ganglio centinela mediante tinción de

Papanicolaou y si a ésta prueba se le añade técnicas de inmunohistoquímica. Los resultados terminan favoreciendo, debido al mayor valor de sensibilidad, a la asociación de ambas pruebas. A continuación, se valoró la tasa de falsos negativos obtenidos en los dos grupos, observando un descenso significativo de dicho valor si se asociaba la inmunohistoquímica a la tinción con Papanicolaou, resultando un 21% en este caso, y un 70% en el conjunto de las biopsias cuyo estudio fue realizado con Papanicolaou (Tabla 26).

**Tabla 26.** Comparación de la agudeza diagnóstica de la técnica de Papanicolaou sola o asociada a inmunohistoquímica<sup>68</sup>. IHQ: Inmunohistoquímica. p: nivel de significación. n.s.: No significativo.

	<b>Papanicolaou (%)</b>	<b>Papanicolaou + IHQ (%)</b>	<b>Valor-p</b>
Sensibilidad	30	79	0,01
Especificidad	99	98	n.s.
Tasa Falsos Negativos	70	21	0,01
Tasa Falsos Positivos	1,3	2,2	n.s.

Fujishima y colaboradores<sup>68</sup> concluyen que la biopsia intraoperatoria debe realizarse por patólogos experimentados, como expresan el resto de publicaciones, y siempre que sea posible por parte del centro u hospital, realizar la asociación de Papanicolaou e inmunohistoquímica. En segundo lugar, y no por ello menos importante, cabe descartar los casos de falsos positivos resultantes del estudio japonés, por tanto la positividad inmunohistoquímica de un ganglio centinela debe ser interpretada con gran precaución y, de ese modo, evitar el diagnóstico erróneo de células tumorales metastásicas.

Esta variedad de datos expuesta hace precisar nuevos horizontes para el diagnóstico de células tumorales en los ganglios extraídos mediante la técnica de la biopsia selectiva del ganglio centinela. Métodos necesarios para aumentar la objetividad del resultado e incrementar la agudeza diagnóstica de la técnica intraoperatoria, así como disminuir el tiempo de espera del resultado en el mismo acto quirúrgico, disminuyendo, todo ello, la morbilidad y mortalidad de la paciente afecta de un cáncer de mama.

En el estudio de Hamidian Jahromi A. y cols.<sup>69</sup> se realizó un análisis citológico mediante la tinción con Hematoxilina-Eosina. Esta técnica falló en la detección de metástasis en 10 ganglios de 6 pacientes, considerando el total de ganglios 146. Por otra parte, se tardó en obtener el resultado intraoperatorio una mediana de 25,7 +/- 6,4 minutos (rango 15-40 minutos), por tanto el tiempo de espera en el campo operatorio hasta obtener el resultado de la afectación del ganglio centinela es elevado, siempre relacionado al número total de ganglios centinelas extraídos y, en segundo lugar, al entrenamiento para dicho estudio del patólogo encargado. La valoración intraoperatoria del ganglio centinela mediante la RT-PCR permite resultados objetivos no operador dependiente y el tiempo de espera durante la intervención es el necesario para la obtención del resultado, sin precisar una preparación.

El artículo publicado por Clarke y cols.<sup>70</sup> en el año 2010 confirma que la curva de aprendizaje es de gran importancia para obtener mejores parámetros de sensibilidad y especificidad de las pruebas a estudio, mientras que en el trabajo actual los datos de dicha curva han sido excluidos puesto que el aprendizaje se realizó con anterioridad. Los datos del trabajo expuesto son resultados de personal experto y subespecializado en

la técnica del ganglio centinela en el cáncer de mama y en el empleo de la RT-PCR, desde el punto de vista del personal del laboratorio de Genómica. En segundo lugar, los datos obtenidos de la fusión de pacientes del Reino Unido, la publicación de Clarke y cols. afianzan lo anteriormente expuesto en relación con las secciones de las muestras de los ganglios centinelas, es decir a mayor número de cortes mejores resultados en los parámetros de detección de micrometástasis en los estudios citológicos, mientras que mediante la RT-PCR este dato no influye en el diagnóstico tanto de dichas micrometástasis así como en la detección de las células tumorales aisladas.

En cuanto al estudio con RT-PCR intraoperatoria existen estudios publicados de pequeño tamaño muestral como es el caso de Tafe L.J. y cols.<sup>71</sup>, año 2010, donde la población a estudio son 59 pacientes como se ha descrito anteriormente. En este trabajo de investigación, se realiza la comparación de la técnica RT-PCR a tiempo real con el procedimiento estandarizado en el centro de referencia, pero la problemática que se observa es que sólo detecta metástasis con un tamaño superior a 0,2 mm. Con la técnica empleada en el laboratorio de Genómica del Hospital Clínico San Carlos, se puede detectar incluso células tumorales aisladas (tamaño que no excede 0,2 mm), verificadas posteriormente por tinción Hematoxilina-Eosina.

El resultado obtenido por Tafe y colaboradores<sup>71</sup> sobre el valor predictivo negativo es de 72,8%, mientras que en el trabajo que se está desarrollando se alcanza una cifra de 90,6%, con la importancia en la práctica clínica que ello conlleva, puesto que el cirujano se está cerciorando que el resultado intraoperatorio mediante técnica molecular no va a obligar a realizar una segunda intervención quirúrgica a la paciente en casi un 91% de

los casos. Por otro lado, la tasa de valor predictivo positivo en el estudio actual es de 58,3%, mientras que este valor desciende a un 13,5% en la publicación de Tafe L.J. y cols., por tanto sólo 8 pacientes fueron diagnosticadas como verdaderos positivos, una cifra relativamente baja considerando la gran repercusión, a nivel de tiempo operatorio, estancia hospitalaria y sobre todo morbilidad, que conlleva la positividad intraoperatoria del ganglio centinela.

Julian y cols.<sup>72</sup>, desarrollaron la validación de la técnica RT-PCR recogiendo un tamaño muestral de 416 pacientes en diferentes estados de Norteamérica. Los parámetros de sensibilidad y especificidad fueron 87,6 % y 94,2%, respectivamente. Uno de los errores más importantes del estudio se constituye en base a los resultados no válidos de la prueba RT-PCR, puesto que los autores catalogan dichos casos como negativos de malignidad y no los excluyen del estudio, como en el trabajo expuesto. Estos datos no válidos fueron de un 2,4% (82 pacientes) y se obtuvieron como consecuencia de una falta de experiencia en el manejo de técnicas moleculares por parte de los operadores. En el estudio actual no existe dicha problemática debido a que el periodo de validación de la técnica en el Hospital Clínico “San Carlos” y, por tanto, la curva de aprendizaje de todo el personal se excluyen de los resultados. El trabajo presentado por Julian y cols. en el año 2008, no establece los valores de sensibilidad y especificidad de la RT-PCR a tiempo real, sino que son resultados en un tiempo posterior a la intervención, por tanto aunque las cifras sean mayores que las del trabajo actual, se debe valorar que la especificidad de la prueba intraoperatoria del estudio que se está exponiendo es de un 87,2%.

En el estudio realizado en Bélgica, publicado en el año 2009 por Martin Martinez I. y cols.<sup>73</sup>, comparan la técnica RT-PCR a tiempo real con los resultados anatomopatológicos para realizar una correcta validación de la técnica. La sensibilidad y especificidad alcanzada por este grupo es elevada, 92% y 97%, respectivamente. El problema se basa en que estos parámetros poseen una serie de limitaciones que pueden ser solventados por la realización de una curva ROC, puesto que el área bajo la curva ROC es el mejor indicador global de la precisión de una prueba diagnóstica. En el trabajo, que se presenta, este parámetro, el área bajo la curva ROC, es 0,769; este valor significa que un individuo seleccionado aleatoriamente del grupo de enfermos tiene un valor de la prueba mayor que uno seleccionado aleatoriamente del grupo de sanos en el 76,9% de las veces.

Schem y cols.<sup>74</sup>, publica un estudio realizado mediante la técnica OSNA, basada en la determinación del número de copias de mRNA de la citoqueratina 19, utilizando un método de amplificación, para el estudio intraoperatorio de la biopsia del ganglio centinela en el cáncer de mama. En la publicación del año 2009, se muestran unas cifras sorprendentes tanto de sensibilidad como de especificidad (98,1% y 90,8%, respectivamente)<sup>75</sup>. En el mismo año se procede a la presentación de un artículo de Tamaki y colaboradores, donde se encuentran cifras de los parámetros de exactitud diagnóstico de 87,5% la sensibilidad y 94,3% la especificidad<sup>76</sup>. Estos resultados del diagnóstico intraoperatorio, mediante OSNA con expresión de mRNA, de metástasis en el ganglio centinela de una paciente afecta de cáncer de mama son llamativos puesto que es una técnica objetiva y rápida que permite mejorar la morbilidad, al igual que la RT-PCR a tiempo real, siendo los parámetros de agudeza diagnóstica en el trabajo

actual realizado en el Hospital Clínico “San Carlos”: sensibilidad de 66,6% y especificidad de 87,2%, inferiores a los obtenidos por OSNA.

El punto débil de los estudios OSNA, publicados hasta el momento, es la incapacidad de realizar una representación global de la exactitud diagnóstica, curva ROC, de la técnica. Esto es debido a que no se realiza una comparación de OSNA con el resultado anatomopatológico del mismo ganglio a estudio, sino con el de un control, no siendo la misma paciente. Por el contrario, los datos intraoperatorios de la técnica RT-PCR a tiempo real llevada a cabo en el trabajo expuesto se valoran en relación a los resultados definitivos del estudio anatomopatológico de la pieza del ganglio centinela. De este modo, se puede realizar la curva ROC (Figura 25), habiéndose obtenido como resultado una cifra, como ya se ha comentado anteriormente, el área bajo la curva de 0,769; siendo su error estándar de 0,65, con un nivel de significación  $p < 0,001$ , siendo estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) y un intervalo de confianza del 95% (0,641-0,897), todo ello demuestra objetivamente que la RT-PCR a tiempo real es un procedimiento diagnóstico de alta precisión. Por consiguiente en el Hospital Clínico “San Carlos” se podría implantar, en un futuro próximo, la técnica OSNA, puesto que en la población de dicha área se demuestra, con este estudio, que la RT-PCR a tiempo real es un método elevada agudeza diagnóstica.

El análisis ROC permite seleccionar los modelos diagnósticos posiblemente óptimos. El mejor método posible de predicción se situaría en un punto localizado en la esquina superior izquierda de la gráfica, también denominado coordenada (0,1) del espacio ROC, puesto que representa un 100% de sensibilidad, ningún caso falso negativo, y un

100% también de especificidad, que conlleva que no existe ningún falso positivo. Por el contrario, una clasificación totalmente aleatoria daría un punto a lo largo de la línea diagonal, línea de no discriminación.

En relación con la influencia de los factores pronóstico en la posibilidad de recidiva tumoral, se han hecho comparaciones entre aquellas pacientes en ausencia de recidiva y con presencia de dicho suceso en función de la intensidad de positividad de los receptores hormonales en la pieza quirúrgica, observándose que dicha relación no fue estadísticamente significativa; este hecho se acontece en igual medida en el caso del análisis del oncogén HER2-neu y el Ki-67. Por el contrario, si la agrupación de los receptores hormonales se realizase en dos grupos, menor o igual al 50% y mayor de 50%, entonces la relación con la presencia o ausencia de recidiva sería estadísticamente significativa.

Cabe añadir, que aunque las diferencias no son estadísticamente significativas, sí se han publicado diversos estudios, en los que se afirma que existe un incremento en la supervivencia o el tiempo libre de enfermedad en aquellas pacientes que presentan una expresión elevada de receptores hormonales en el estudio anatomopatológico del tumor<sup>77,78</sup>, esto puede ser debido a las diversas formas de agrupación. De igual manera, se observa que la sobreexpresión del oncogén HER2-neu en el carcinoma de mama, favorece una peor respuesta al tratamiento endocrino adyuvante<sup>78,79</sup>. Por consiguiente, aunque el descubrimiento de este oncogén, en la pieza intraoperatoria, no está relacionado con el desarrollo de metástasis tumoral, sí es cierto que se produce un incremento debido a una mala respuesta al tratamiento asociado.

Los resultados inmunohistoquímicos son factores pronóstico de gran importancia sobre la evolución del cáncer de mama y su respuesta frente al tratamiento. De este modo, es relevante establecer la relación de los mismos con respecto al resultado extrapolado de la RT-PCR a tiempo real.

La relación del índice de positividad de los receptores hormonales con el resultado positivo o negativo para malignidad en la RT-PCR intraoperatoria no ha sido estadísticamente significativa, pero se ha encontrado muy próxima al nivel de significación. De la tabla de contingencia se puede extrapolar que el 68% de las pacientes con resultado negativo para RT-PCR presentan cifras de receptores hormonales superiores al 50%, por tanto se ve la asociación de los casos con resultado negativo para malignidad y un valor de buen pronóstico, alto índice de expresión de dichos receptores.

Otro estudio analítico, imprescindible, para establecer una correcta validación de la RT-PCR intraoperatoria es la valoración de la relación estadística de sus resultados con la determinación de la afectación tumoral del ganglio centinela, siendo la prueba “gold standard”, en el momento actual, el análisis anatomopatológico del ganglio centinela. En la tabla de contingencia resultante de este análisis, se objetiva como el 90,6% de las pacientes con ganglios negativos para malignidad en la RT-PCR presentaron un resultado negativo en el estudio anatomopatológico definitivo. Por el contrario, el 58,3% de las pacientes con positividad en la RT-PCR obtuvieron un diagnóstico de metástasis en el ganglio centinela por anatomía patológica ( $p < 0,001$ ). Con todo ello se puede extrapolar el concepto que el estudio realizado en el Hospital Clínico “San

Carlos” mediante el empleo de la RT-PCR a tiempo real permite discriminar intraoperatoriamente y de manera estadísticamente significativa a aquellas pacientes con un ganglio centinela positivo o negativo para malignidad.

De las 11 pacientes que presentaron recidiva tumoral durante el periodo de seguimiento, 40 meses, un 36,4% con diagnóstico de micrometástasis mediante RT-PCR no habían sido diagnosticadas por Hematoxilina-Eosina intraoperatoria; mientras que sólo un caso de los que recidivó no presentaba un resultado positivo para malignidad en la RT-PCR y sí mediante Hematoxilina-Eosina.

Tras la aplicación de la prueba de “Log Rank”, se concluye que el tiempo libre de enfermedad de las pacientes con resultado negativo para malignidad del ganglio centinela en la RT-PCR a tiempo real es mejor que aquellas que obtuvieron un dato positivo en dicha prueba, siendo estadísticamente significativo ( $p = 0,021$ ). La supervivencia libre de enfermedad a los 40 meses en el grupo clasificado por ser negativa la RT-PCR a tiempo real es de 37,3 meses (intervalo de confianza, IC, del 95%, 35.5-39.2) descendiendo a 28,5 meses (IC 95%, 20.8-36.2) en el grupo con resultado positivo para malignidad mediante RT-PCR. Masuda N. y cols.<sup>80</sup> describen el descenso del periodo libre de enfermedad tanto a los 5 como a los 10 años de aquellas pacientes que fueron diagnosticadas de micrometástasis en la biopsia de ganglio centinela mediante RT-PCR. Las diferencias con respecto al estudio publicado en el trabajo actual son dos, la primera de ellas, que Masuda sólo hace la valoración de la supervivencia en aquellos casos que exclusivamente tengan micrometástasis, no

macrometástasis, y, en segundo lugar, la RT-PCR no se realiza de manera intraoperatoria.

La detección de micrometástasis por RT-PCR a tiempo real contribuye a disminuir el tiempo libre de enfermedad de forma estadísticamente significativa.

Por consiguiente, la técnica objeto de estudio en este trabajo, la RT-PCR a tiempo real, es un marcador ideal para el estudio de la biopsia intraoperatoria del ganglio centinela, puesto que es un dato objetivo, rápido y reproducible, dado que su resultado no es un valor cualitativo dependiente del observador. Este dato establece la diferencia, de gran relevancia, con respecto a los resultados anatomopatológicos resultantes de un estudio intraoperatorio de la pieza quirúrgica del ganglio centinela.

Debido a la baja sensibilidad y a la necesidad de personal con experiencia y habilidad para un correcto diagnóstico intraoperatorio mediante estudio anatomopatológico, muchos centros precisan de un gran número de reintervenciones, para completar el tratamiento del carcinoma de mama y realizar, de este modo, la linfadenectomía axilar. Esto conlleva un elevado índice de morbilidad para la paciente. A la vista de todos los resultados obtenidos en el estudio se puede concluir que la técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa cuantitativa a tiempo real en el ganglio centinela es una solución diagnóstica intraoperatoria que muchos hospitales pueden adoptar y que puede incrementar la estandarización en la identificación de las metástasis del ganglio centinela, al ser un método molecular rápido y objetivo, de una elevada precisión diagnóstica.

## **CONCLUSIONES**

- 1.** La RT-PCR a tiempo real es tanto por los parámetros de agudeza diagnóstica como por el área bajo la curva ROC, obtenida en el estudio, un procedimiento de alta precisión diagnóstica.
- 2.** Existe una relación estadísticamente significativa entre los resultados de la biopsia intraoperatoria del ganglio centinela y la RT-PCR a tiempo real.
- 3.** Los resultados obtenidos mediante RT-PCR convencional y RT-PCR a tiempo real son idénticos en todas las pacientes.
- 4.** El resultado positivo de la prueba (RT-PCR a tiempo real) conlleva un aumento en la probabilidad de recidiva tumoral. Esta predicción no se consigue con otros factores de pronóstico en la misma población.

**ANEXOS**



## **ANEXO 1. CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA BIOPSIA SELECTIVA DEL GANGLIO CENTINELA EN TUMORES DE MAMA**

*Nombre del paciente:*

*D.N.I.:*

*Nº Historia Clínica:*

Declaro que el Dr./a. D/Dña ..... me ha informado que para una correcta estadificación y, por tanto, para un tratamiento más adecuado de mi cáncer de mama derecha-izquierda es necesario realizar una biopsia selectiva del ganglio centinela (GC).

El GC es el primer ganglio linfático que entra en contacto con las células cancerosas cuando éstas se diseminan desde el tumor primario. La localización más habitual es en la grasa axilar (bajo el brazo); otras localizaciones son la mamaria interna (entre las costillas), el hueco supraclavicular o el cuello.

Mediante este procedimiento se pretende identificar la(s) zona(s) de drenaje del tumor mamario, localizar el (los) ganglio(s) centinela y extirparlos de forma independiente para poder hacer un estudio selectivo de los mismos. De este análisis depende el tratamiento posterior.



Esta técnica consiste en la inyección **alrededor de la tumoración / alrededor de la areola / en la piel** de un marcador isotópico .....

Pasadas unas horas o al día siguiente se procederá a la biopsia del GC, asociándola o no al tratamiento quirúrgico de su tumor.

Se realizará **SÍ – NO** análisis intraoperatorio del GC y si dicha biopsia fuera positiva, se hará una linfadenectomía axilar. Si fuese negativa, habrá que esperar al estudio histológico definitivo para decidir tratamiento.

En su caso **no – se** utilizará el marcado complementario con colorante vital ..... – **azul de metileno**.

Comprendo que a pesar de la adecuada elección de la técnica y de su correcta realización pueden presentarse efectos indeseables, tanto los comunes derivados de toda intervención y que pueden afectar a todos los órganos y sistemas, como otros específicos del procedimiento:

- Poco graves y frecuentes: infección o sangrado de la herida quirúrgica, colección de líquido en la herida (serosa), flebitis, edema transitorio, cicatrices dolorosas, hipertróficas o retráctiles, dolor en la zona de la intervención.



- Poco frecuentes y graves: inflamación grave de los linfáticos, recidiva tumoral, hemorragia importante, alteraciones locales de los nervios, reacciones alérgicas al colorante vital, necrosis de la piel y subcutáneo con azul de metileno.

El médico me ha explicado que estas complicaciones habitualmente se resuelven con tratamiento médico (medicamentos, sueros).

He comprendido las explicaciones que se me han facilitado y el facultativo que me ha atendido me ha contestado las dudas que he planteado.

También comprendo que en cualquier momento y sin necesidad de dar ninguna explicación, puedo revocar el consentimiento que ahora presto.

Y en tales condiciones CONSIENTO que se me realice la biopsia del ganglio centinela.

En ....., a ..... de ..... de 20.....

Fdo.: Paciente o representante legal

Fdo. Médico: Dr./Dra.

Nº de colegiado:



---

## REVOCACIÓN

Nombre:

REVOCO el consentimiento prestado en fecha ..... y no deseo proseguir el tratamiento, que doy con esta fecha por finalizado.

En Madrid, a ..... de ..... de 20.....

Fdo.: Paciente o representante legal

Fdo. Médico: Dr./Dra.

Nº de colegiado:



**ANEXO 2. DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA DONACIÓN DE TEJIDO**

Doña .....  
de ..... años de edad con domicilio en .....  
..... y D.N.I. nº .....

(Representante)Don / Doña .....  
de ..... años de edad, con domicilio en .....  
..... y D.N.I. nº .....  
en calidad de REPRESENTANTE LEGAL, FAMILIAR o ALLEGADO DE:  
.....

**AUTORIZO:**

A que el personal médico utilice, para fines de investigación actual y de futuro, los tejidos y/o fluidos corporales obtenidos de las intervenciones médico-quirúrgicas que me van a ser practicadas, una vez realizado el diagnóstico adecuado de mi enfermedad. Todos los datos obtenidos serán manejados con la máxima confidencialidad y de acuerdo con la ley 15/99 de Protección de Datos de carácter personal.



Me reservo expresamente el derecho a revocar mi consentimiento en cualquier momento.

En ..... (LUGAR Y FECHA)

Fdo. EL MÉDICO

Fdo. EL PACIENTE

#### REVOCACIÓN

Doña ..... de ..... años de edad con domicilio en ..... y D.N.I. nº ..... (Representante) Don/Doña ..... de ..... años de edad, con domicilio en ..... y D.N.I. nº ..... en calidad de REPRESENTANTE LEGAL, FAMILIAR O ALLEGADO DE: .....

Revoco el consentimiento prestado en fecha ..... y no deseo proseguir el tratamiento, que doy con esta fecha por finalizado.

En ..... (LUGAR Y FECHA)

Fdo. EL MÉDICO

Fdo. EL PACIENTE

## **BIBLIOGRAFÍA**

- <sup>1</sup> Asociación Española Contra el Cáncer (AECC). [www.todocancer.com](http://www.todocancer.com).
- <sup>2</sup> Centro Nacional de Epidemiología Instituto de Salud Carlos III. [www.isciii.es](http://www.isciii.es).
- <sup>3</sup> Fundamentos de Ginecología. Bajo Arenas JM; Laila Vicens JM; Xercavins Montosa J. Ed. Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia 2009.
- <sup>4</sup> Baselga J, Gelmon KA, Verma S, Wardley A, Conte P, Miles D, et al. Phase II trial of pertuzumab and trastuzumab in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer that progressed during prior trastuzumab therapy. *J Clin Oncol* 2010, Feb 1.
- <sup>5</sup> Hsueh EC, Giuliano AE. Sentinel lymph node technique for staging of breast cancer. *The Oncologist* 1998;3:165-170.
- <sup>6</sup> 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.
- <sup>7</sup> Borgstein PJ, Pijpers R, Comans EF, van Diest PJ, Boom RP, Meijer S. Sentinel lymph node biopsy in breast cancer: guidelines and pitfalls of lymphoscintigraphy and gamma probe detection. *J Am Coll Surg* 1998;186:275-283.
- <sup>8</sup> Turner RR, Ollila DW, Stern S, Giuliano AE. Optimal histopathologic examination of the sentinel lymph node for breast carcinoma staging. *Am J Surg Pathol* 1999;23:263-267.
- <sup>9</sup> Giuliano AE, Dale PS, Turner RR, Morton DL, Evans SW, Krasne DL. Improved axillary staging of breast cancer with sentinel lymphadenectomy. *Ann Surg* 1995;222:394-401.
- <sup>10</sup> Morton DL. Intraoperative lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy: community standard care or clinical investigation? *Cancer J Sci Am* 1997;3:328-330.
- <sup>11</sup> Dauway EL, Giuliano R, Pendas S, Haddad F, Costello D, Cox CE, et al. Lymphatic mapping: a technique providing accurate staging for breast cancer. *Breast Cancer* 1999;6:145-154.
- <sup>12</sup> Veronesi U, Paganelli G, Viale G, Galimberti V, Luini A, Zurrada S, et al. Sentinel lymph node biopsy and axillary dissection in breast cancer: results in a large series. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:368-373.
- <sup>13</sup> Posther KE, Wilke LG, Giuliano AE. Sentinel lymph node dissection and the current status of American trials on breast lymphatic mapping. *Semin Oncol* 2004;31:426-436.
- <sup>14</sup> White RL, Wilke LG. Update on the NSABP and ACOSOG breast cancer sentinel node trials. *Am Surg* 2004;70:420-424.

- <sup>15</sup> Yared MA, Middleton LP, Smith TL, Kim HW, Ross MI, Hunt KK, Sahin AA. Recommendations for sentinel lymph node processing in breast cancer. *Am J Surg Pathol* 2002;26(3):377-382.
- <sup>16</sup> Veronesi U, Paganelli G, Viale G, Luini A, Zurrada S, Galimberti V, et al. Sentinel-lymph-node biopsy as a staging procedure in breast cancer: update of a randomised controlled study. *Lancet* 2006;7:983-990.
- <sup>17</sup> Dabbs DJ, Fung M, Landsittel D, McManus K, Johnson R. Sentinel lymph node micrometastasis as a predictor of axillary tumor burden. *Breast J* 2004;10(2):101-105.
- <sup>18</sup> Piñero A, Giménez J, Merck B, Vázquez C, Grupo de Expertos. Consenso sobre la biopsia selectiva del ganglio centinela en el cáncer de mama. Madrid, Marzo 2010.
- <sup>19</sup> Choi SH, Barsky SH, Chang HR. Clinicopathologic analysis of sentinel lymph node mapping in early breast cancer. *Breast J* 2003;9(3):153-162.
- <sup>20</sup> Grupo de Consenso para ganglio centinela en Oncología Ginecológica y Mamaria. SEGO 2009.
- <sup>21</sup> Kaufmann M, Morrow M, von Mickwitz G, Harris JR, The Biedenkopf Expert Panel Members. Locoregional treatment of primary breast cancer. Consensus recommendations from an International Expert Panel. *Cancer* 2010;3:1184-1191.
- <sup>22</sup> Cox CE, Pendas S, Cox JM, Joseph E, Shons AR, Yeatman T, et al. Guidelines for sentinel node biopsy and lymphatic mapping of patients with breast cancer. *Ann Surg* 1998;227(5):645-653.
- <sup>23</sup> Langer I, Marti WR, Guller U, Moch H, Harder F, Oertli D, Zuber M. Axillary recurrence rate in breast cancer patients with negative sentinel lymph node (SLN) or SLN micrometastases. *Ann Surg* 2005;241:152-158.
- <sup>24</sup> de Widt-Levert LM, Tjan-Heijnen VCG, Bult P, Ruers TJM, Wobbes T. Stage migration in breast cancer: surgical decisions concerning isolated tumour cells and micro-metastases in the sentinel lymph node. *EJSO* 2003;29:216-220.
- <sup>25</sup> Rampaul RS, Miremadi A, Pinder SE, Lee A, Ellis IO. Pathological validation and significance of micrometastasis in sentinel nodes in primary breast cancer. *Breast Cancer Res* 2001;3:113-116.
- <sup>26</sup> Moreno A, Román JM, Ruiz J, Cabrera M, González A, Carreras JL et al. Biopsia del ganglio centinela en el carcinoma de mama: validación de la técnica radioisotópica. *Prog Obstet Ginecol* 2005;48(9):436-43.
- <sup>27</sup> González-Palacios Martínez, JF. Una nueva modificación en la clasificación TNM del cáncer mamario. *Rev Esp Patolog* 2004;37(3)247-251.

- <sup>28</sup> Cserni G. Metastases in axillary sentinel lymph nodes in breast cancer as detected by intensive histopathological workup. *J Clin Pathol* 1999;52:922-924.
- <sup>29</sup> Treseler PA and Tauchi PS. Pathologic Analysis of the Sentinel Lymph Node. *Surg Clin North Am* 2000;80(6):1695-1719.
- <sup>30</sup> Viale G, Bosari S, Maxxarol G, Galimberti V, Luini A, Veronesi P, et al. Intraoperative examination of axillary sentinel lymph nodes in breast carcinoma patients. *Cancer* 1999;85(11):2433-2438.
- <sup>31</sup> Cserni G. Complete sectioning of axillary sentinel nodes in patients with breast cancer. Analysis of two different step sectioning and immunohistochemistry protocols in 246 patients. *J Clin Pathol* 2002;55:926-931.
- <sup>32</sup> 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 and isolated tumour cells. Analysis of 174 patients after SLN biopsy. *EJSO* 2007;33:33-38.
- <sup>33</sup> Wang HY, Sun JM, Lu HF, Shi DR, Ou ZL, Ren YL, Fu SQ. Micrometastasis detected by cytokeratin 19 expression in sentinel lymph nodes of patients with early-stage cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2006;16:643-648.
- <sup>34</sup> Van Trappen PO, Gyselman VG, Lowe DG, Ryan A, Oram DH, Bosze P, et al. Molecular quantification and mapping of lymph-node micrometastases in cervical cancer. *Lancet* 2001;357(6):15-20.
- <sup>35</sup> Zehentner BK, Carter D. Mammaglobin: a candidate diagnostic marker for breast cancer. *Clin Chem* 2004;37:249-257.
- <sup>36</sup> 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.
- <sup>37</sup> 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.
- <sup>38</sup> Zafrakas 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.

- <sup>39</sup> Roncella S, Ferro P, Bacigalupo B, Dessanti P, Giannico A, Gorji N, et al. Relationship between Human Mammaglobin mRNA expression in breast cancer tissue and clinico-pathologic features of the tumors. *J Exp Clin Cancer Res* 2006;25(1):65-72.
- <sup>40</sup> Watson MA, Dintzis S, Darrow CM, Voss LE, DiPersio J, Jensen R, Fleming TP. Mammaglobin expression in primary, metastatic and occult breast cancer. *Cancer Res* 1999;59:3028-3031.
- <sup>41</sup> 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.
- <sup>42</sup> Zehentner BK, Dillon DC, Jiang Y, Xu J, Bennington A, Molesh DA, et al. 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.
- <sup>43</sup> Justus Min C, Tafra L, Verbanac KM. Identification of superior markers for polymerase chain reaction detection of breast cancer metastases in sentinel lymph nodes. *Cancer Research* 1998;58(15):4581-4584.
- <sup>44</sup> Sakaguchi M, Virmani A, Dudak MW, Peters GN, Leitch AM, Saboorian H, et al. Clinical relevance of reverse transcriptase-polymerase chain reaction for the detection of axillary lymph node metastases in breast cancer. *Ann Surg Oncol* 2003; Vol.10(2):117-125.
- <sup>45</sup> 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.
- <sup>46</sup> Masuda N, Tamaki Y, Sakita I, Ooka M, Ohnishi T, Kadota M, et al. Clinical significance of micrometastases in axillary lymph nodes assessed by reverse transcription-polymerase chain reaction in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2000;6:4176-4185.
- <sup>47</sup> Godfrey TE, Raja S, Finkelstein SD, Gooding WE, Kelly LA, Luketich JD. Prognostic value of Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction in lymph node-negative esophageal. *Clin Cancer Res* 2001;7:4041-4048.
- <sup>48</sup> Perou ChM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees ChA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000 Aug 17;406(6797):747-52.
- <sup>49</sup> Weigelt B, Baehner FL, Reis-Filho JS. The contribution of gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction: a retrospective of the last decade. *J Pathol* 2010; 220: 263–280.

- <sup>50</sup> Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:10869–10874.
- <sup>51</sup> Román Santamaría JM, Moreno Elola A. Estadificación del cáncer de mama y programas de cribado en cáncer de mama. Tratado de cáncer de mama. Vol. I. 2008.p.37-58.
- <sup>52</sup> Mucientes J, Farge K, Cardona J, Moreno A, Delgado-Bolton R, Izarduy L, *et al.* SPECT-TAC: una nueva herramienta para la localización del ganglio centinela en pacientes con cáncer de mama. *Rev Esp Med Nucl* 2008;27(3):183-90.
- <sup>53</sup> Ortega Granados AL, Alonso Calderón R, Sánchez Muñoz A, Collado Marín R, García Tapiador AM, Jaén Morago AM, Sánchez Rovira P. Tratamiento adyuvante en cáncer de mama HER2 positivo. Tratado de cáncer de mama. Vol. II. 2008.p.31-53.
- <sup>54</sup> Jatoi I, Anderson WF, Rosenberg PS. Qualitative age-interactions in breast cancer. A tale of two diseases? *Am J Clin Oncol* 2008; 31:504-506.
- <sup>55</sup> Couto E, Hemminki K. Estimates of heritable and environmental components of familial breast cancer using family history information. *Br J Cancer* 2007;96(11):1740-1742.
- <sup>56</sup> Nothacker M, Duda V, Hahn M, Warm M, Degenhardt F, Madjar H, *et al.* Early detection of breast cancer: benefits and risks of supplemental breast ultrasound in asymptomatic women with mammographically dense breast tissue. A systematic review. *BMC Cancer* 2009;9:335.
- <sup>57</sup> Berg WA, Blume JD, Cormack JB, Mendelson EB, Lehrer D, Böhm-Vélez M, *et al.* Combined screening with ultrasound and mammography vs mammography alone in women at elevated risk of breast cancer. *JAMA* 2008;299(18):2151-63.
- <sup>58</sup> McCaffery KJ, Jansen J. Pre-operative MRI for women with newly diagnosed breast cancer: Perspectives on clinician and patient decision-making when evidence is uncertain. *Breast* 2010;19(1):10-12.
- <sup>59</sup> Buck AK, Herrmann K, Stargardt T, Dechow T, Krause BJ, Schreyögg J. Economic evaluation of PET and PET/CT in Oncology: Evidence and Methodologic Approaches. *J Nucl Med* 2010 Feb 11.
- <sup>60</sup> Czernin J, Benz MR, Allen-Auerbach MS. PET/CT imaging: The incremental value of assessing the glucose metabolic phenotype and the structure of cancers in a single examination. *Eur J Radiol* 2010 Jan 22.
- <sup>61</sup> Lin KM, Patel TH, Ray A, Ota M, Jacobs L, Kuvshinoff B, *et al.* Intradermal radioisotope is superior to peritumoral blue dye or radioisotope in identifying breast cancer sentinel nodes. *J Am Coll Surg* 2004;199(4):561-6.

- <sup>62</sup> Barranger E, Antoine M, Grahek D, Callard P, Uzan S. Intraoperative imprint cytology of sentinel nodes in breast cancer. *J Surg Oncol* 2004;86:128–133.
- <sup>63</sup> Chicken DW, Kocjan G, Falzon M, Lee AC, Douek M, Sainsbury R, Keshtgar MR. Intraoperative touch imprint cytology for the diagnosis of sentinel lymph node metastases in breast cancer. *Br J Surg* 2006;93:572–576.
- <sup>64</sup> Nagashima T, Suzuki M, Yagata H, Nikaido T, Horiuchi F, Koda K, Miyazaki M. Intraoperative cytologic diagnosis of sentinel node metastases in breast cancer. *Acta Cytol* 2003;47:1028–1032.
- <sup>65</sup> Motomura K, Inaji H, Komoike Y, Kasugai T, Nagumo S, Noguchi S, Koyama H. Intraoperative sentinel lymph node examination by imprint cytology and frozen section during breast surgery. *Br J Surg* 2000;87:597–601.
- <sup>66</sup> Motomura K, Nagumo S, Komoike Y, Koyama H, Inaji H. Accuracy of imprint cytology for intraoperative diagnosis of sentinel node metastases in breast cancer. *Ann Surg* 2008;247: 839–842.
- <sup>67</sup> Rubio IT, Korourian S, Cowan C, Krag DN, Colvert M, Klimberg VS. Use of touch preps for intraoperative diagnosis of sentinel lymph node metastases in breast cancer. *Ann Surg Oncol* 1998;5:689–694.
- <sup>68</sup> Fujishima M, Watatani M, Inui H, Hashimoto Y, Yamamoto N, Hojo T, et al. Touch imprint cytology with cytokeratin immunostaining versus Papanicolaou staining for intraoperative evaluation of sentinel lymph node metastasis in clinically node-negative breast cancer. *EJSO* 2009;35: 398-402.
- <sup>69</sup> Hamidian Jahromi A, Narayanan S, MacNeill F, Osin P, Nerurkar A, Gui G. Testing the feasibility of intra-operative sentinel lymph node touch imprint cytology. *Ann R Coll Surg Engl* 2009;91(4):336-9.
- <sup>70</sup> Clarke D, Leung E, Chachlani N, Rowlands D, Simon J, Hero I, England D. Intraoperative assessment of sentinel node using imprint cytology. *World J Surg* 2010;34:55–61.
- <sup>71</sup> Tafe LJ, Schwab MC, Lefferts JA, Wells WA, Tsongalis GJ. A validation study of a new molecular diagnostic assay: The Dartmouth-Hitchcock Medical Center experience with the GeneSearch™ BLN assay in breast sentinel lymph nodes. *Exp Mol Pathol* 2010 Feb;88(1):1-6.
- <sup>72</sup> Julian TB, Blumencranz P, Deck K, Whitworth P, Berry DA, Berry SM, et al. Novel intraoperative molecular test for sentinel lymph node metastases in patients with early-stage breast cancer. *J Clin Oncol* 2008;26(20):3338-45.

- <sup>73</sup> Martin Martinez I, Veys S, Majjaj L, Lespagnard JC, Schobbens G, Rouas V, et al. Clinical validation of a molecular assay for intra-operative detection of metastases in breast sentinel lymph nodes. *EJSO* 2009;35:387-392.
- <sup>74</sup> Visser M, Jiwa M, Horstman A, Brink A, 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;122:2562–2567.
- <sup>75</sup> Schem Ch, Maass N, Bauerschlag DO, Carstensen MH, Löning T, Roder Ch, 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;454:203–210.
- <sup>76</sup> Tamaki Y, Akiyama F, Iwase T, Kaneko T, Tsuda H, Sato K, et al. Molecular detection of lymph node metastases in breast cancer patients: results of a multicenter trial using the one-step nucleic acid amplification assay. *Clin Cancer Res* 2009;15(8):2879-2884.
- <sup>77</sup> Early Breast Cancer Trialist' Collaborative Group. Tamoxifen for early breast cancer: An overview of the randomized trials. *Lancet* 1998;351:1451-1467.
- <sup>78</sup> Puglisi F, Minisini AM. Adjuvant endocrine therapy in postmenopausal breast cancer patients: Does hormone receptor status influence decision-making? *Crit Rev Oncol/Hematol* 2010, doi:10.1016/j.critrevonc.2010.01.006.
- <sup>79</sup> Lipton A, Ali SM, Leitzel K, Demers L, Chinchilli V, Engle L, et al. Elevated serum Her-2/neu level predicts decreased response to hormone therapy in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2002;20:1467–72.
- <sup>80</sup> Masuda N, Tamaki Y, Sakita I, Ooka M, Ohnishi T, Kadota M, et al. Clinical significance of micrometastases in axillary lymph nodes assessed by reverse transcription-polymerase chain reaction in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2000;6:4176-4185.

## **ABREVIATURAS**

<b>A.D.N. o D.N.A.:</b>	Ácido Desoxirribonucleico.
<b>A.J.C.C.:</b>	American Joint Committee on Cancer.
<b>A.P.:</b>	Anatomía Patológica.
<b>A.R.N. o R.N.A.:</b>	Ácido Ribonucleico.
<b>A.T.C.:</b>	Células Tumorales Aisladas.
<b>B.A.G.:</b>	Biopsia con Aguja Gruesa.
<b>B.R.C.A.1:</b>	Breast Cancer 1, gen del “cáncer de mama” 1.
<b>B.R.C.A.2:</b>	Breast Cancer 2, gen del “cáncer de mama” 2.
<b>B.S.G.C.:</b>	Biopsia Selectiva del Ganglio Centinela.
<b>°C:</b>	Grados Centígrados.
<b>Ca.:</b>	Carcinoma.
<b>C.A.T.-D:</b>	Catepsina-D.
<b>C.E.A.:</b>	Antígeno Carcinoembrionario.
<b>C.I.S.H.:</b>	Chromogenic In Situ Hybridation.
<b>C.K.:</b>	Citoqueratina.
<b>C.K.19:</b>	Citoqueratina 19.
<b>c.m.:</b>	Centímetros.
<b>cols.:</b>	Colaboradores.
<b>C.P.S.:</b>	Cuentas Por Segundo.
<b>Ct:</b>	Valor del ciclo umbral (threshold cycle).
<b>D.C.I.S.:</b>	Carcinoma Ductal In Situ.
<b>dNTPs:</b>	Dinucleótidos Trifosfato.
<b>E.E.U.U.:</b>	Estados Unidos.
<b>E.G.F.R.:</b>	Receptor del factor de crecimiento epidérmico.

<b>F.D.A.:</b>	Food and Drug Administration.
<b>F.I.S.H.:</b>	Fluorescence In Situ Hybridation
<b>G.A.B.A.<math>\pi</math>:</b>	Subunidad $\pi$ del receptor tipo A de la $\gamma$ -aminobutirato.
<b>G.C.:</b>	Ganglio Centinela.
<b>H.C.S.C.:</b>	Hospital Clínico “San Carlos”.
<b>H.E.:</b>	Hematoxilina-Eosina.
<b>h-M.A.M.:</b>	Mamoglobina Humana.
<b>Hpr:</b>	Proteína relacionada con la haptoglobulina.
<b>I.C.:</b>	Intervalo de Confianza.
<b>I.H.Q.:</b>	Inmunohistoquímica.
<b>L.C.I.S.:</b>	Carcinoma Lobulillar In Situ.
<b>L.E.H.R.:</b>	Colimadores de baja energía y alta resolución.
<b>L.E.U.H.R.:</b>	Colimadores de baja energía y resolución ultra alta.
<b>L.H.R.H.:</b>	Análogos de la hormona liberadora de gonadotropina.
<b>mCi:</b>	Milicurios.
<b>M.G.:</b>	Mamoglobina.
<b>m.g.:</b>	Miligramos.
<b>m.m.:</b>	Milímetros.
<b>M.U.C.-1:</b>	Mucina implicada en la adhesión intercelular.
<b>n:</b>	Tamaño muestral.
<b>Nº:</b>	Número.
<b>n.s.:</b>	No significativo.
<b>N.S.A.B.P.:</b>	National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project.
<b>O.S.N.A.:</b>	One Step Nucleic Acid Amplification.

<b>p:</b>	Nivel de significación.
<b>P.A.A.F.:</b>	Punción Aspiración con Aguja Fina.
<b>Pap:</b>	Tinción de Papanicolaou.
<b>P.B.G.D.:</b>	Porfobilinógeno Desaminasa.
<b>P.C.R.:</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa.
<b>P.E.M.:</b>	Mucinas Epiteliales Polimórficas.
<b>P.E.T.:</b>	Tomografía con Emisión de Positrones.
<b>QRT-PCR:</b>	Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Inversa Cuantitativa.
<b>R.M.:</b>	Resonancia Magnética Nuclear.
<b>R.O.C.:</b>	Curvas de Operación Característica del Receptor (Receiver-Operating Characteristic).
<b>R.R.:</b>	Riesgo Relativo.
<b>RT-LAMP:</b>	Reverse Transcriptase Loop-Mediated Isothermal Amplification.
<b>RT-PCR:</b>	Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Inversa.
<b>Sº:</b>	Servicio.
<b>S.E.G.O.:</b>	Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia.
<b>S.E.S.P.M.:</b>	Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria.
<b>S.P.-1:</b>	Beta-1-glicoproteína específica de la gestación.
<b>S.P.E.C.T.-T.A.C.:</b>	Tomografía Computarizada por Emisión de Fotones Simples- Tomografía Axial Computerizada
<b>S.T.A.R.:</b>	Estudio sobre Tamoxifeno y Raloxifeno.
<b>T.C.:</b>	Tomografía Axial Computerizada.

<b>Tc-99m:</b>	Tecnecio 99 metaestable.
<b>T.G.F.- <math>\beta</math>:</b>	Factor de Crecimiento Tumoral.
<b>U.E.:</b>	Unión Europea.
<b>V.E.G.F.:</b>	Factor de Crecimiento de Endotelio Vascular.