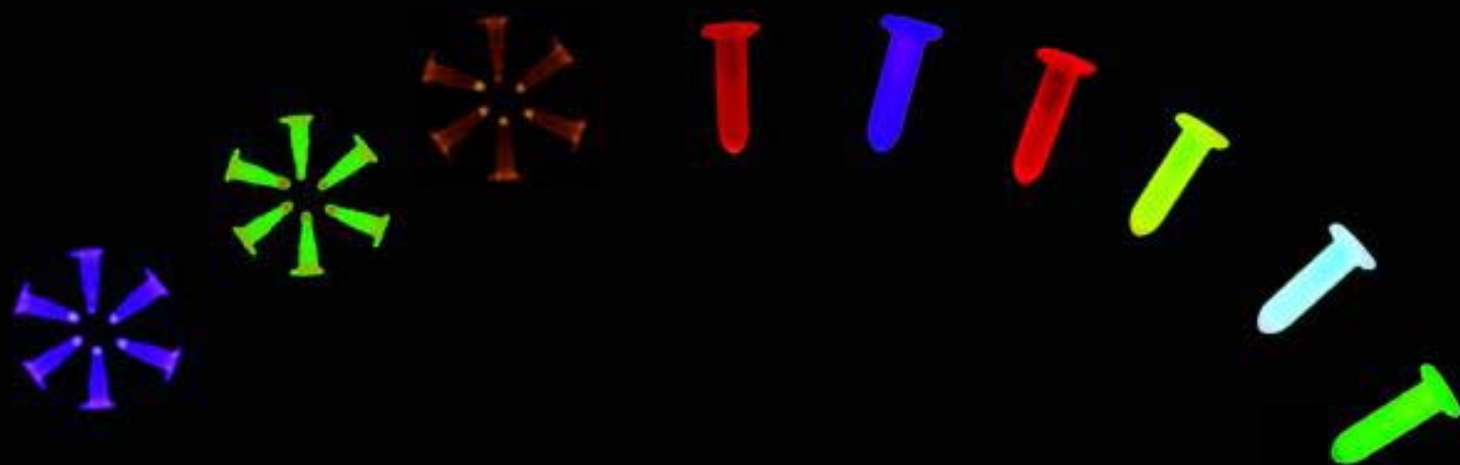


DETECCIÓN DE CÉLULAS EPITELIALES EN GANGLIOS LINFÁTICOS MEDIANTE RT-PCR

Análisis de la eficacia de distintos métodos
en el diagnóstico de ganglios centinelas en
cáncer de mama.



Tesis Doctoral
Mar Varela Rodríguez
2007



UNIVERSITAT DE BARCELONA



*Creo en el alba oír un atareado
rumor de multitudes que se alejan;
son los que me han querido y olvidado;
espacio y tiempo y Borges ya me dejan.*

Jorge Luis Borges, 1960

A mis padres y a mi hermana

A Abelardo

Esta tesis ha sido el fruto del esfuerzo propio y de la colaboración de un grupo de gente, que con su trabajo diario o bien con su apoyo me han permitido conseguir dicho objetivo.

Por lo tanto quiero agradecer a toda la gente que forma parte del Institut Català d'Oncologia y del Hospital Universitari de Bellvitge, especialmente al personal de Anatomía Patológica, a la Unitat Funcional de Mama y a la gente del Laboratori de Recerca Translacional, por haberme acogido a lo largo de estos años.

Especialmente quiero dar las gracias a Abelardo Moreno y Agustín Escobedo, por confiar en mi y ser un ejemplo de tesón y perseverancia al margen de las circunstancias.

A Cati Falo por la emoción que transmite a todo lo que hace.

A Edurne Arriola por ser una trabajadora infatigable con sentido del humor.

A Ester Villalba por soportar el día a día y ser la mejor compañera.

A M^a Angels Lerín, Sergio Herrero y Ruth Tascón, por compartir diariamente, esos menús tan exquisitos con unas risas.

A Dori Garcia, Esther Brines, Manoli Alonso, Núria Codina, Carlos Puerto, Silvia Estivill, Cristina y Yolanda Gallego, por ser los mejores amigos con los que uno puede contar.

A Nayana Abarca y Laia Fernández por imaginar negocios imposibles.

A Paco Rico y Josep M^a Pujal, por compartir una etapa muy divertida.

A Mercedes Piñón y Yolanda Cámara por mantener la amistad en la distancia.

A Laura Casadomé por luchar contra las injusticias.

A todos ellos

Gracias

ABREVIATURAS

99mTc	Tecnecio 99 metaestable
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
B2M	β 2-Microglobulina
BAG	Biopsia con aguja gruesa
C	Número de ciclo
cDNA	DNA complementario
CEA	Estudio costo eficacia
CISH	Hibridación in situ cromogénica
CP	<i>Crossing point</i>
HUB	Hospital Universitari de Bellvitge
Ct	<i>Threshold cycle</i>
DCIS	Carcinoma ductal in situ
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DTT	Ditiotreitol
E	Eficiencia
FAM TM	5-carboxyfluorescein
FISH	Hibridación in situ con sonda fluorescente
FRET	Energía transferencia de resonancia de Förster
GAPDH	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
GC	Ganglio centinela
H&E	Hematoxilina-eosina
HER2-neu	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
I.C.	Intervalo de confianza
ICO	Institut Català d'Oncologia
IHQ	Inmunohistoquímica
Ki67	Antígeno identificado por el anticuerpo monoclonal Ki-67
KRT19	Citoqueratina 19
LCIS	Carcinoma lobulillar in situ
LMC	Leucemia mieloide crónica
LSAB	Estreptavidina-biotina
MGB	<i>Minor Groove Binder</i>
MMG	Mamaglobina
MMGB	Mamaglobina B
MIC	Carcinoma microinvasivo
mM	Milimolar
MMLV	Virus de la Leucemia Murina de Moloney
mRNA	RNA mensajero
N0	Cantidad de producto inicial
NC	Medida de fluorescencia
Nm	Nanomolar
OR	<i>Odds ratio</i> , Razón de probabilidades
PAAF	Punción-aspiración con aguja fina
pb	Pares de bases
PBGD	Porfobilinógeno deaminasa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PIP	Factor inductor de la prolactina
pmol	Picomol
RE	Receptores de estrógenos
RNAse	Ribonucleasa
ROC	<i>Receiver Operating Characteristics</i>
ROX	6-carboxi-X-rodamina
RP	Receptores de progesterona
rRNA	RNA ribosómico
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa inversa
TAMRA TM	6-carboxitetrametilo-rodamina
TET TM	6-carboxi-1,4-dicloro-2',7'-dicloro-fluoresceína

T _m	Temperatura de fusión del producto
TMA	Matrices/"arrays" de tejidos
U	Unidad
UFM	Unitat Funcional de Mama
VIC™	6-carboxifluoresceína
μl	Microlitro

ÍNDICE

ÍNDICE.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABLAS.....	v
ÍNDICE DE GRÁFICOS	ix
I. INTRODUCCIÓN.....	4
1. CÁNCER DE MAMA Y FACTORES DE PRONÓSTICO.....	4
2. ASPECTOS GENERALES DE LA METÁSTASIS EN EL CÁNCER DE MAMA.....	7
MODELOS DEL PROCESO METASTÁSICO.....	9
3. GANGLIO CENTINELA	11
4. DIAGNÓSTICO.....	16
4.1. DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO RUTINARIO.....	17
4.2. DIAGNÓSTICO MOLECULAR.....	21
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
1. DETERMINACIÓN DE FACTORES DE PRONÓSTICO BIOLÓGICOS.....	41
A. TIPOS HISTOLÓGICOS.....	41
B. VALORACIÓN GRADO HISTOLÓGICO.....	43
C. VALORACIÓN RECEPTORES HORMONALES.....	43
D. VALORACIÓN KI67.....	44
E. VALORACIÓN HER2-neu.....	44
F. PERMEACIÓN VASCULAR.....	45
2. DEFINICIONES DEL TNM EN EL CÁNCER DE MAMA.....	46
3. CLASIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS TUMORES.....	48
4. CLASIFICACIÓN DE St. GALLEN EN GRUPOS DE RIESGO.....	48
5. TOMA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	48
6. TÉCNICA RT-PCR.....	50
6.1. PREPARACIÓN DEL cDNA.....	50
6.2. RT-PCR ESTÁNDAR.....	50
7. REAL-TIME RT-PCR.....	52
7.1. DETERMINACIÓN DE LOS VALORES RELATIVOS.....	55
7.2. ANÁLISIS DE DATOS CUANTITATIVOS MEDIANTE <i>LinRegPCR</i>	56
8. TÉCNICA INMUNOHISTOQUÍMICA.....	58
9. TÉCNICA HIBRIDACIÓN IN SITU: FISH Y CISH.....	59
FISH.....	59
CISH.....	60
10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	61
III. HIPÓTESIS.....	66
IV. OBJETIVOS.....	70
V. RESULTADOS.....	74
1. DESCRIPTIVOS DE LA SERIE TUMORAL.....	74
A. CARCINOMA INFILTRANTE.....	75
B. CARCINOMA IN SITU Y MICROINVASIVOS.....	83
2. ANÁLISIS DE LAS TÉCNICAS RT-PCR.....	89
2.1. ESTUDIO INICIAL DE COMPARACIÓN RT-PCR ESTÁNDAR Y RT-PCR REAL TIME.....	89

2.2.	ESTUDIO INICIAL DE COMPARACIÓN RT-PCR Y ANALISIS ANATOMOPATOLÓGICO...	90
2.3.	ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE DISTINTAS PLATAFORMAS REAL TIME	93
2.4.	ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE DISTINTOS MÉTODOS DE NORMALIZACIÓN.	100
3.	RESULTADOS PCR COMPARATIVA CON APA.....	104
1.	SERIE GLOBAL.	104
2.	TUMORES INFILTRANTES	108
3.	TUMORES INTRADUCTALES Y MICROINVASIVOS.....	139
4.	ESTUDIO COSTO-EFICACIA	141
<i>VI.</i>	<i>DISCUSIÓN.....</i>	<i>146</i>
<i>VII.</i>	<i>CONCLUSIONES.....</i>	<i>170</i>
<i>VIII.</i>	<i>BIBLIOGRAFÍA.....</i>	<i>174</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1: Pasos secuenciales en la diseminación de células tumorales.</i>	7
<i>Figura 2: Modelo de proceso metastático sobre stem cells.</i>	10
<i>Figura 3: Dibujo esquemático de la inyección peritumoral y del flujo ganglionar unidireccional.</i>	12
<i>Figura 4: Diferenciación celular y expresión de citoqueratinas.</i>	15
<i>Figura 5: Algunos patrones de error en la identificación de micrometástasis utilizando diferentes estrategias de corte.</i>	20
<i>Figura 6: Método de Regresión de Ajuste de Puntos (Fit Points). Ajuste de las curvas exponenciales a una recta (umbral).</i>	24
<i>Figura 7: Método de la Segunda Derivada.</i>	25
<i>Figura 8 Curvas de melting características del producto amplificado y de la formación de dímeros de primers.</i>	26
<i>Figura 9: Principales factores que influyen en la eficiencia de la reacción de PCR.</i>	31
<i>Figura 10: Cálculo de la eficiencia de la reacción a partir de la gráfica de las rectas patrón.</i>	32
<i>Figura 11: Cálculo de la eficiencia individual de una muestra, utilizando la regresión lineal.</i>	33
<i>Figura 12: Eficiencias de amplificación del gen de referencia B2M y de la KRT19. Representación gráfica de los CP frente al logaritmo de la concentración de cDNA</i>	55
<i>Figura 13: Análisis de datos generados por la plataforma Lightcycler mediante el programa LinReg PCR.</i>	57

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1: Relación de factores de pronóstico clásicos en el cáncer de mama.</i>	5
<i>Tabla 2: Principales tipos de agentes intercalantes y sondas utilizados en la Real Time PCR.</i>	29
<i>Tabla 3: Tamaños y tipos histológicos de los tumores infiltrantes con baja probabilidad de afectación ganglionar.</i>	39
<i>Tabla 4: Criterios de evaluación del grado histológico tumoral (Sistema de evaluación de Nottingham).</i>	43
<i>Tabla 5: Criterios de evaluación del estado del HER2 mediante hibridación in situ.</i>	45
<i>Tabla 6: Corrección del número de copias del HER2 en el caso de baja amplificación.</i>	45
<i>Tabla 7: Estadificación anatomopatológica "pT" (TUMORAL).</i>	46
<i>Tabla 8: Estadificación anatomopatológica "pN" (GANGLIONAR).</i>	47
<i>Tabla 9: Criterios utilizados en la clasificación en grupos de riesgo según St. Gallen.</i>	48
<i>Tabla 10: Primers utilizados en la RT-PCR.</i>	51
<i>Tabla 11: Primers utilizados en la RT-PCR Real-Time.</i>	53
<i>Tabla 12 : Primers y sonda utilizados en la RT-PCR Real-Time plataforma Applied.</i>	54
<i>Tabla 13: Características de los anticuerpos utilizados en la IHQ.</i>	58
<i>Tabla 14: Frecuencia y porcentaje de los tipos de carcinomas infiltrantes estudiados.</i>	75
<i>Tabla 16: Frecuencias y porcentajes del estado axilar en función de la estadificación pN, en la serie de carcinoma infiltrante.</i>	77
<i>Tabla 17: Frecuencias y porcentajes de la presencia de permeación vascular en el tumor primario, en la serie de carcinoma infiltrante.</i>	78
<i>Tabla 18: Frecuencias y porcentajes de la presencia de tumores multicéntricos, en la serie de carcinoma infiltrante.</i>	78
<i>Tabla 20: Frecuencias y porcentajes del grado histológico tumoral, en la serie de carcinoma infiltrante.</i>	79
<i>Tabla 21: Frecuencias y porcentajes de la expresión IHQ del RE en el tumor primario, en la serie de carcinoma infiltrante.</i>	79
<i>Tabla 22: Frecuencias y porcentajes de la expresión IHQ del RP en el tumor primario, en la serie de carcinoma infiltrante.</i>	80
<i>Tabla 23: Frecuencias y porcentajes de la expresión IHQ de Kí67 en el tumor primario, en la serie de carcinoma infiltrante.</i>	80
<i>Tabla 24: Frecuencias y porcentajes del estado del HER2 En el tumor primario, en la serie de carcinoma infiltrante.</i>	80
<i>Tabla 25: Frecuencias y porcentajes de los tipos tumorales luminal, triple negativo y HER2, en la serie de carcinoma infiltrante.</i>	81
<i>Tabla 26: Frecuencias y porcentajes de los tumores clasificados según la clasificación de riesgo de St. Gallen, en la serie de carcinoma infiltrante.</i>	81
<i>Tabla 27: Frecuencias y porcentajes de los tipos de carcinomas in situ y microinvasivos.</i>	83
<i>Tabla 28: Frecuencia y porcentaje de los tamaños tumorales en función de la estadificación pT, en la serie de carcinomas in situ y microinvasivos.</i>	83
<i>Tabla 29: Frecuencias y porcentajes del estado axilar en función de la estadificación pN, en la serie de carcinoma in situ y microinvasivo.</i>	84
<i>Tabla 30: Frecuencias y porcentajes del estado axilar en función de la estadificación pN, en la serie de carcinoma in situ.</i>	84
<i>Tabla 31: Frecuencias y porcentajes del estado axilar en función de la estadificación pN, en la serie de carcinoma microinvasivo.</i>	84
<i>Tabla 32: Frecuencias y porcentajes del grado histológico tumoral, en la serie de carcinoma in situ.</i>	85
<i>Tabla 33: Frecuencias y porcentajes del grado histológico tumoral, en la serie de carcinoma microinvasivo.</i>	85
<i>Tabla 34: Frecuencias y porcentajes de la expresión IHQ del RE en el tumor primario, en la serie de carcinoma in situ.</i>	86
<i>Tabla 35: Frecuencias y porcentajes de la expresión IHQ del RP en el tumor primario, en la serie de carcinoma in situ.</i>	86
<i>Tabla 36: Frecuencias y porcentajes de la expresión IHQ del RE en el tumor primario, en la serie de carcinoma microinvasivo.</i>	86

Tabla 37: Frecuencias y porcentajes de la expresión IHQ del RP en el tumor primario, en la serie de carcinoma microinvasivo.	87
Tabla 38: Frecuencias y porcentajes de la expresión IHQ del Ki67 en el tumor primario, en la serie de carcinoma microinvasivo.	87
Tabla 39: Frecuencias y porcentajes de los tipos tumorales luminal y HER2, en la serie de carcinoma microinvasivos.	87
Tabla 40: Frecuencias y porcentajes de los tumores clasificados según la clasificación de riesgo de St. Gallen, en la serie de carcinoma microinvasivo.	88
Tabla 41: Resultado de la prueba de suma de rangos de Mann-Whitney. Comparación de las medias de los niveles de expresión (Real-time) de las muestras pN0 y pN0(mol+) (RT-PCR clásica).	90
Tabla 42: Frecuencias y porcentajes de la evaluación anatomopatológica del GC en la serie de control.	91
Tabla 43: Tabla de contingencia comparativa de los resultados del estudio anatomopatológico y la RT-PCR clásica.	91
Tabla 44: Resultado de la prueba de suma de rangos de Mann-Whitney. Comparación de las medias de los niveles de expresión (Real-time) de las muestras pN0(sn), pN0(i+)(sn) y pN1a (sn) en la serie de control.	92
Tabla 45: Tabla de contingencia comparativa de los resultados del estudio anatomopatológico y la Real-Time RT-PCR.	93
Tabla 46: Resultado de la prueba de suma de rangos de Mann-Whitney. Comparación de las medias de los niveles de expresión de las muestras según el resultado anatomopatológico, en las diferentes plataformas Real-time.	93
Tabla 47: Área bajo la curva ROC. Evaluación de la plataforma Lightcycler (Roche) como método de detección de afectación ganglionar.	94
Tabla 48: Área bajo la curva ROC. Evaluación de la plataforma Applied como método de detección de afectación ganglionar.	96
Tabla 49: Niveles de expresión de las lesiones benignas en las plataformas Real-time.	97
Tabla 50: Niveles medios de expresión de las muestras analizadas mediante plataforma Roche.	97
Tabla 51: Niveles medios de expresión de las muestras analizadas mediante plataforma Applied.	97
Tabla 52: Niveles medios de expresión de las muestras analizadas en ambas plataformas en función del resultado anatomopatológico.	98
Tabla 53: Medias de los valores de expresión de las muestras analizadas mediante estudio anatomopatológico en función del método de normalización empleado.	100
Tabla 54: Resultado de la prueba de suma de rangos de Mann-Whitney. Comparación de las medias de los niveles de expresión según resultado anatomopatológico en los diferentes métodos de normalización).	101
Tabla 55: Área bajo la curva ROC. Evaluación de los diferentes métodos de normalización, recta patrón y LinReg.	102
Tabla 56: Variabilidad entre replicas empleado métodos de normalización distintos.	103
Tabla 57: Frecuencias y porcentajes de la detección de afectación del GC, en la serie global. ...	104
Tabla 58: Tabla de contingencia comparativa de los resultados del estudio anatomopatológico y la RT-PCR, en la serie global.	105
Tabla 59: Análisis de la asociación entre el tipo histológico tumoral (infiltrante vs DCIS y microinvasivo) y la presencia de afectación del GC detectado mediante técnicas anatomopatológicas.	106
Tabla 60: Análisis de la asociación entre el tipo histológico tumoral (infiltrante vs DCIS y microinvasivo) y la presencia de afectación del GC detectado mediante técnicas moleculares.	107
Tabla 61: Análisis de la asociación entre el tipo histológico tumoral (infiltrante vs DCIS y microinvasivo) y la presencia de afectación del GC detectado por técnicas anatomopatológicas y técnicas moleculares.	108
Tabla 62: Frecuencias y porcentajes de afectación del GC en la serie de tumores infiltrantes, según tipo histológico y método de detección empleado.	109
Tabla 63: Análisis de la asociación entre el tipo histológico de carcinoma infiltrante lobulillar y la presencia de afectación del GC detectado por técnicas anatomopatológicas.	109
Tabla 64: Análisis de la asociación entre el tipo histológico de carcinoma infiltrante lobulillar y la presencia de afectación del GC detectado por técnicas moleculares.	110

<i>Tabla 65: Análisis de la asociación entre la estadificación tumoral (pT) y la presencia de afectación del GC detectado por técnicas anatomopatológicas.</i>	112
<i>Tabla 66: Análisis de la asociación entre la estadificación tumoral (pT) y la presencia de afectación del GC detectado por técnicas moleculares.</i>	113
<i>Tabla 67: Análisis de la asociación entre la estadificación tumoral (pT) y la presencia de afectación del GC detectado por técnicas anatomopatológicas y moleculares.</i>	114
<i>Tabla 68: Análisis de la asociación entre el grado histológico y la presencia de afectación del GC detectado por técnicas anatomopatológicas y moleculares.</i>	116
<i>Tabla 69: Análisis de la asociación entre el grado histológico (grado 1 y 2 agrupado vs 3) y la presencia de afectación del GC detectado mediante técnicas anatomopatológicas.</i>	117
<i>Tabla 70: Análisis de la asociación entre el grado histológico (grado 1 y 2 agrupado vs 3) y la presencia de afectación del GC detectado mediante técnicas moleculares.</i>	118
<i>Tabla 71: Análisis de la asociación entre el grado histológico (grado 1 y 2 agrupado vs 3) y la presencia de afectación del GC detectado mediante técnicas anatomopatológicas y moleculares.</i>	119
<i>Tabla 72: Análisis de la asociación entre la presencia de permeación vascular en el tumor primario y la afectación del GC detectado mediante técnicas anatomopatológicas.</i>	120
<i>Tabla 73: Análisis de la asociación entre la presencia de permeación vascular en el tumor primario y la afectación del GC detectado mediante técnicas moleculares.</i>	121
<i>Tabla 74: Análisis de la asociación entre la presencia de permeación vascular en el tumor primario y la afectación del GC detectado mediante técnicas anatomopatológicas y moleculares.</i>	122
<i>Tabla 75: Análisis de la asociación entre la clasificación de riesgo de St. Gallen y la afectación del GC detectado mediante técnicas anatomopatológicas.</i>	128
<i>Tabla 76: Análisis de la asociación entre la clasificación de riesgo de St. Gallen y la afectación del GC detectado mediante técnicas moleculares.</i>	129
<i>Tabla 77: Análisis de la asociación entre la clasificación de riesgo de St. Gallen y la afectación del GC detectado mediante técnicas anatomopatológicas y moleculares.</i>	130
<i>Tabla 78: Resumen de las principales características clínico-patológicas de la serie de tumores infiltrantes en función de la detección de afectación ganglionar según los distintos métodos empleados.</i>	132
<i>Tabla 79: Análisis de la asociación entre la clasificación de riesgo de St. Gallen (Riesgo medio y alto agrupado) y la estadificación axilar (pN).</i>	133
<i>Tabla 80: Análisis de la asociación entre la presencia de permeación vascular en el tumor primario y la estadificación axilar (pN).</i>	134
<i>Tabla 81: Estudio multivariado mediante regresión logística de la presencia de afectación del GC detectada mediante técnicas anatomopatológicas en función de la presencia de permeación vascular en el tumor primario y la clasificación de riesgo de St. Gallen.</i>	136
<i>Tabla 82: Estudio multivariado mediante regresión logística de la presencia de afectación del GC detectada mediante técnicas moleculares en función de la presencia de permeación vascular en el tumor primario y la clasificación de riesgo de St. Gallen.</i>	137
<i>Tabla 83: Estudio multivariado mediante regresión logística de la presencia de afectación del GC detectada mediante técnicas anatomopatológicas y moleculares en función de la presencia de permeación vascular en el tumor primario y la clasificación de riesgo de St. Gallen.</i>	138
<i>Tabla 84: Estudio costo eficacia de las técnicas de IHQ y RT-PCR.</i>	141
<i>Tabla 85: Etapas y duración de la técnica IHQ.</i>	142
<i>Tabla 86: Etapas y duración de la técnica RT-PCR.</i>	143
<i>Tabla 87: Estudios sobre tasas de recaídas locales en pacientes con GC positivo y sin linfadenectomía.</i>	147
<i>Tabla 88: Resumen de los estudios realizados sobre GC de pacientes con diagnóstico final de DCIS.</i>	155
<i>Tabla 89: Revisión de la detección de afectación axilar en pacientes con DCISM sobre las que se realizó la técnica de linfadenectomía o ganglio centinela.</i>	156
<i>Tabla 90: Estudios publicados sobre la detección de afectación axilar mediante RT-PCR.</i>	160
<i>Tabla 91: Paneles de marcadores de mRNA utilizados en la detección de metástasis en ganglios axilares de pacientes con cáncer de mama, mediante Real-time PCR.</i>	166

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Principales tipos histológicos de la serie tumoral.	74
Gráfico 2: Histograma de frecuencias de los tamaños tumorales en función de la clasificación pT.	76
Gráfico 3 Histograma de frecuencias del estado axilar en función de la clasificación pN.	77
Gráfico 4: Curva ROC. Evaluación de la plataforma lightcycler (Roche) para la detección de afectación axilar.	95
Gráfico 5: Curva ROC. Evaluación de la plataforma Applied para la detección de afectación axilar.	96
Gráfico 6: Histograma de las medias de los niveles de expresión en función de la estadificación axilar.	99
Gráfico 7: Curvas ROC. Evaluación de los dos métodos de normalización empleados, recta patrón y LinReg.	102
Gráfico 8: Barras de error de la variabilidad entre replicas utilizando los dos métodos de normalización.	103
Gráfico 9: Histograma comparativo del resultado molecular del análisis del GC vs el resultado anatomopatológico en la serie global (%).	105
Gráfico 10: Histograma comparativo del resultado anatomopatológico del análisis del GC y el tipo histológico tumoral - infiltrante vs DCIS y microinvasivo - (%).	106
Gráfico 11: Histograma comparativo del resultado molecular del análisis del GC y el tipo histológico tumoral - infiltrante vs DCIS y microinvasivo - (%).	107
Gráfico 12: Histograma comparativo del resultado del análisis anatomopatológico y molecular del GC y el tipo histológico tumoral - infiltrante vs DCIS y microinvasivo - (%).	108
Gráfico 13: Histograma comparativo del resultado del análisis anatomopatológico del GC y el tipo histológico de carcinoma lobulillar infiltrante (%).	110
Gráfico 14: Histograma comparativo del resultado del análisis molecular del GC y el tipo histológico de carcinoma lobulillar infiltrante (%).	111
Gráfico 15: Histograma comparativo del resultado del análisis histopatológico del GC y la estadificación tumoral pT (%).	113
Gráfico 16: Histograma comparativo del resultado del análisis molecular del GC y la estadificación tumoral pT (%).	114
Gráfico 17: Histograma comparativo del resultado del análisis anatomopatológico y molecular del GC y la estadificación tumoral pT (%).	115
Gráfico 18: Histograma comparativo del resultado del análisis anatomopatológico y molecular del GC y el grado histológico (%).	116
Gráfico 19: Histograma comparativo del resultado del análisis anatomopatológico del GC y el grado histológico - grado 1 y 2 agrupado vs 3 - (%).	117
Gráfico 20: Histograma comparativo del resultado del análisis molecular del GC y el grado histológico – grado 1 y 2 agrupado vs 3 - (%).	118
Gráfico 21: Gráfico 22: Histograma comparativo del resultado del análisis anatomopatológico y molecular del GC y el grado histológico – grado 1 y 2 agrupado vs 3 - (%).	119
Gráfico 23: Histograma comparativo del resultado del análisis anatomopatológico del GC y la presencia de permeación vascular en el tumor primario (%).	121
Gráfico 24: Histograma comparativo del resultado del análisis molecular del GC y la presencia de permeación vascular en el tumor primario (%).	122
Gráfico 25: Histograma comparativo del resultado del análisis anatomopatológico y molecular del GC y la presencia de permeación vascular en el tumor primario (%).	123
Gráfico 26: Histograma comparativo del resultado del análisis anatomopatológico del GC y la clasificación de riesgo de St. Gallen (%).	129
Gráfico 27: Histograma comparativo del resultado del análisis molecular del GC y la clasificación de riesgo de St. Gallen (%).	130
Gráfico 28: Histograma comparativo del resultado del análisis anatomopatológico y molecular del GC y la clasificación de riesgo de St. Gallen (%).	131
Gráfico 29: Histograma comparativo de la clasificación de riesgo de St. Gallen (riesgo medio y alto agrupado) y la estadificación axilar- pN -(%).	134
Gráfico 30: Histograma comparativo entre la presencia de permeación vascular en el tumor primario y la estadificación axilar- pN -(%).	135

INTRODUCCIÓN

DETECCIÓN DE CÉLULAS EPITELIALES EN GANGLIOS LINFÁTICOS MEDIANTE RT-PCR.

Análisis de la eficacia de distintos métodos en el diagnóstico de ganglios centinelas en cáncer de mama.

I. INTRODUCCIÓN

1. CÁNCER DE MAMA Y FACTORES DE PRONÓSTICO

El cáncer de mama es una enfermedad sistémica. Un gran número de mujeres presentan diseminación metastásica durante la primera década, tras el tratamiento locorregional. La información sobre el estado de los ganglios axilares que drenan el tumor primario es fundamental y tiene incidencia en el curso de la enfermedad y en la supervivencia a largo plazo.

En los últimos años, dos factores han contribuido a aumentar el intervalo libre de enfermedad y la supervivencia global de las pacientes. Uno ha sido el diagnóstico precoz de la enfermedad, cada vez se diagnostica en estados más iniciales y el segundo factor lo constituye los tratamientos sistémicos - quimioterapia en adyuvancia y hormonoterapia - (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, 1998).

En la práctica rutinaria actual, el diagnóstico se acompaña de una serie de marcadores y factores pronósticos que tratan de predecir el curso evolutivo de la enfermedad y la respuesta a determinados tratamientos. El diagnóstico precoz favorece un mejor pronóstico, pero no asegura que no existirá recurrencia. Los factores pronósticos se emplean para realizar una estimación de dicho riesgo en estadíos tempranos.

Las características fenotípicas del tumor tales como el grado nuclear, el tipo histológico, el estado de los receptores hormonales y de algunos receptores de superficie de factores epiteliales de crecimiento o indicadores de proliferación celular, dan información sobre el riesgo de recurrencia. Algunos de estos factores tienen utilidad pronóstica, otros son predictivos de respuesta a la terapia, y la mayoría poseen ambos aspectos, pronóstico y predictivos (Tabla 1).

Tabla 1: Relación de factores de pronóstico clásicos en el cáncer de mama.

FACTOR	USO CLÍNICO	DETERMINANTES METASTÁSICOS	DETALLES
ESTADO GANGLIONAR	ESTABLECIDO	Si no hay metástasis ganglionares, el riesgo es bajo; si existen metástasis ganglionares, el riesgo es elevado; la presencia de más de 4 ganglios afectados, está asociado con muy mal pronóstico.	Relacionado con el tamaño tumoral
TAMAÑO TUMORAL	ESTABLECIDO	Tumores de menos de 2 cm de diámetro tienen bajo riesgo de metastatizar; los tumores de 2-5 cm tienen un riesgo elevado; tumores de más de 5 cm tienen un riesgo muy alto.	Marcador de pronóstico independiente.
GRADO HISTOLÓGICO	ESTABLECIDO	Los tumores de Grado 1 tienen bajo riesgo; los tumores de Grado 2 muestran riesgo intermedio; los tumores de Grado 3 tienen un riesgo elevado de metastatizar.	Relacionado con el tamaño tumoral
INVASIÓN VASCULAR	ESTABLECIDO EN PACIENTES CON GANGLIOS NEGATIVOS	La presencia de más de 3 émbolos tumorales en vasos vasculares están asociados con metástasis.	En pacientes con ganglios negativos
RECEPTORES HORMONALES	ESTABLECIDO PARA DECIDIR EL TRATAMIENTO EN ADYUVANCIA	Niveles bajos está asociado con metástasis.	Predice la recidiva a corto plazo (5 años); relacionado con el grado histológico.
HER2-neu	ESTABLECIDO PARA DECIDIR EL TRATAMIENTO EN ADYUVANCIA	Amplificación/sobreexpresión HER2-neu está asociado con metástasis.	Beneficio en las nuevas terapias (<i>Trastuzumab</i>).

Existe un amplio rango de subtipos histológicos de cáncer de mama invasivo. Algunos de los subtipos muestran un pronóstico favorable, aunque el tipo histológico por si sólo es sólo un indicador débil de recidiva.

El factor pronóstico más importante en el cáncer de mama es la metástasis ganglionar. La presencia de células tumorales en ganglios linfáticos es un factor determinante en la estadificación del cáncer de mama, que determina la supervivencia y ayuda en la indicación del tratamiento sistémico (Fisher et al., 1983; Foster, 1996). El valor pronóstico está asociado con el riesgo de recidiva sistémica y junto con las características del tumor primario se utiliza para determinar los beneficios de la quimioterapia. Clásicamente, la estadificación axilar se estudiaba a través del vaciado axilar o linfadenectomía, a partir de los años 70 se inician estudios buscando una nueva alternativa, el ganglio centinela, con el mismo valor pronóstico que la linfadenectomía y con valor predictivo como indicador inmediato de enfermedad residual en la axila, pero ofreciendo una menor morbilidad.

2. ASPECTOS GENERALES DE LA METÁSTASIS EN EL CÁNCER DE MAMA

La teoría más aceptada entorno al desarrollo de metástasis se basa en la diseminación de células tumorales por parte del tumor primario. El tumor puede invadir directamente el estroma adyacente, infiltrar órganos o cavidades, o diseminarse a distancia a través del torrente circulatorio o del sistema linfático (Chambers et al., 2002).

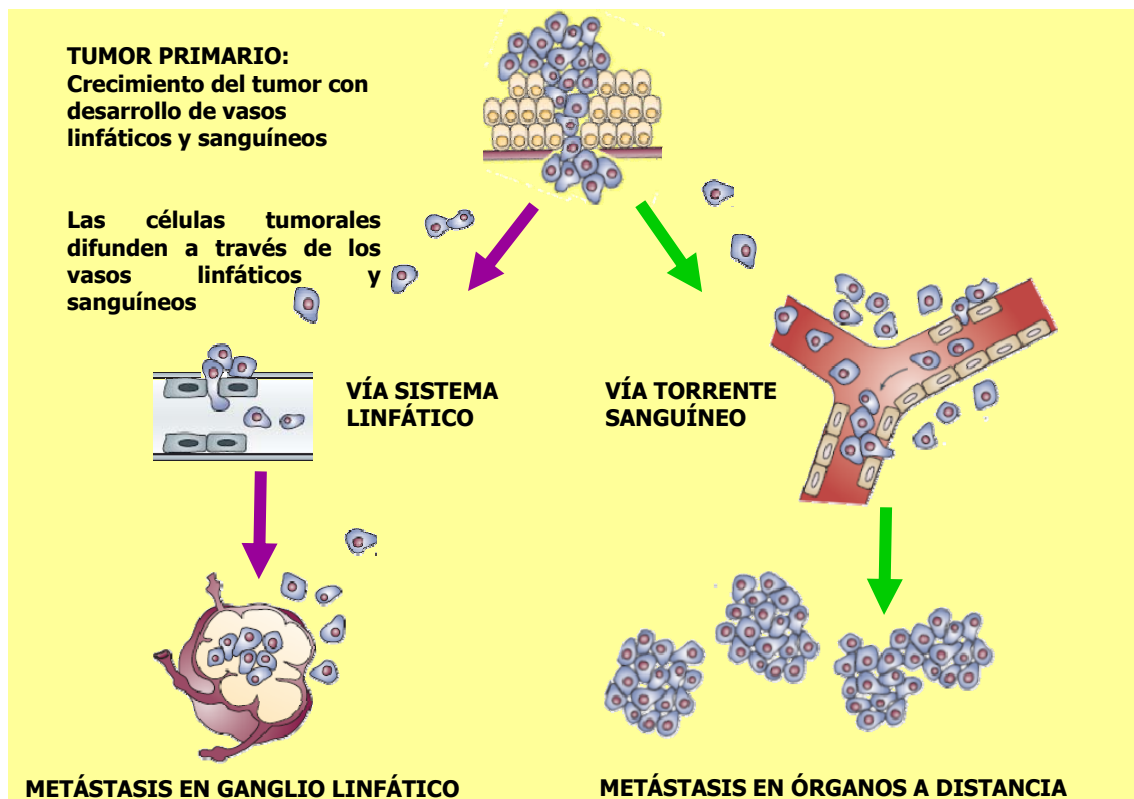
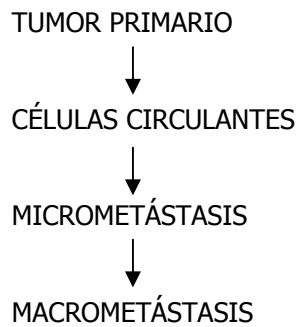


Figura 1: Pasos secuenciales en la diseminación de células tumorales.

El proceso consiste en una serie de pasos secuenciales (Figura 1). Inicialmente las células deben invadir los canales circundantes, vasculares o linfáticos, a través de los cuales son transportadas y deben sobrevivir al sistema inmunitario.

En el caso del cáncer de mama, en estados iniciales, la vía linfática parece la principal vía de diseminación de células tumorales (Cunnick et al., 2002; Pickren, 1956; Van Trappen & Pepper, 2002).

Las células circulantes tumorales, deben extravasarse, proliferar y migrar a una localización adecuada, donde inicialmente forman la micrometástasis. Una vez implantada, secreta una serie de factores que promueven la angiogénesis y puede crecer superando los 2 mm de diámetro, dando lugar a la macrometástasis.



El tumor primario está compuesto, por una población celular heterogénea. El significado clínico de las células tumorales aisladas a distancia del tumor primario es incierto; con frecuencia se detectan en diferentes órganos (por ejemplo, ganglios, sangre periférica o médula ósea), los experimentos de videomicroscopía *in vivo*, han demostrado que el número de micrometástasis que llegan a desarrollarse a partir de estas células, es pequeño (1/40), y sólo un 1% tiene la habilidad de progresar a macrometástasis (MacDonald et al., 2002).

MODELOS DEL PROCESO METASTÁSICO

Las propiedades metastásicas de las células tumorales, han sido estudiadas desde finales de los 70 a través de ensayos experimentales de metástasis. Dichos estudios han dado lugar a una serie de modelos. Desde el modelo tradicional que sugiere que sólo algunas subpoblaciones de células tumorales adquieren capacidad metastásica en etapas tardías de la tumorigénesis - (Fidler & Kripke, 1977) - surgieron diferentes teorías que intentaron conciliar las diferencias experimentales encontradas con la posible selección de un fenotipo metastático.

En la actualidad, varias observaciones han modificado los modelos existentes:

1. La observación de que el microambiente estromal puede afectar al desarrollo del cáncer de mama, indica que la progresión podría ser más complicada que la teoría lineal aceptada de activación e inactivación de genes supresores de tumores y oncogenes. Esta observación cuestiona por lo tanto que los modelos de estudio de metástasis *in vitro* y/o en animales, se puedan trasladar directamente al modelo de metástasis en el cáncer de mama humano (Bhowmick et al., 2004; Bissell & Labarge, 2005).
2. Los estudios de expresión, tanto del tumor primario y su correspondiente metástasis -transcriptoma muy similar- (Weigelt et al., 2003), como los perfiles genéticos de expresión mediante microarrays, - perfiles genéticos de buen y mal pronóstico - (van 't Veer et al., 2002) indican que la propiedad de metastatizar se produce durante las primeras etapas y es una característica inherente al propio tumor.
3. Las células madre *-stem cells-*, son células con capacidad de autorenovarse y diferenciarse, dando todos los linajes celulares que forman el tejido maduro. La transformación oncogénica de estas células produciría células con capacidad de iniciar nuevos tumores, lo que las distinguiría del resto de células tumorales (Reya et al., 2001).

En el nuevo modelo propuesto, las mutaciones oncogénicas pueden tener lugar sobre células madre de mama (*stem cell*) o sobre células diferenciadas (Figura 2). En el primer caso, la transformación de la célula madre puede generar tumores con perfil de expresión de mal pronóstico y bajo la influencia de los fibroblastos estromales - sólo la población de *stem cells* del tumor - tendría la habilidad de metastatizar. Dichas *stem cells* podrían expresar perfiles de expresión específicos que difieren en la propensión a metastatizar a un tejido determinado (Weigelt et al., 2005).

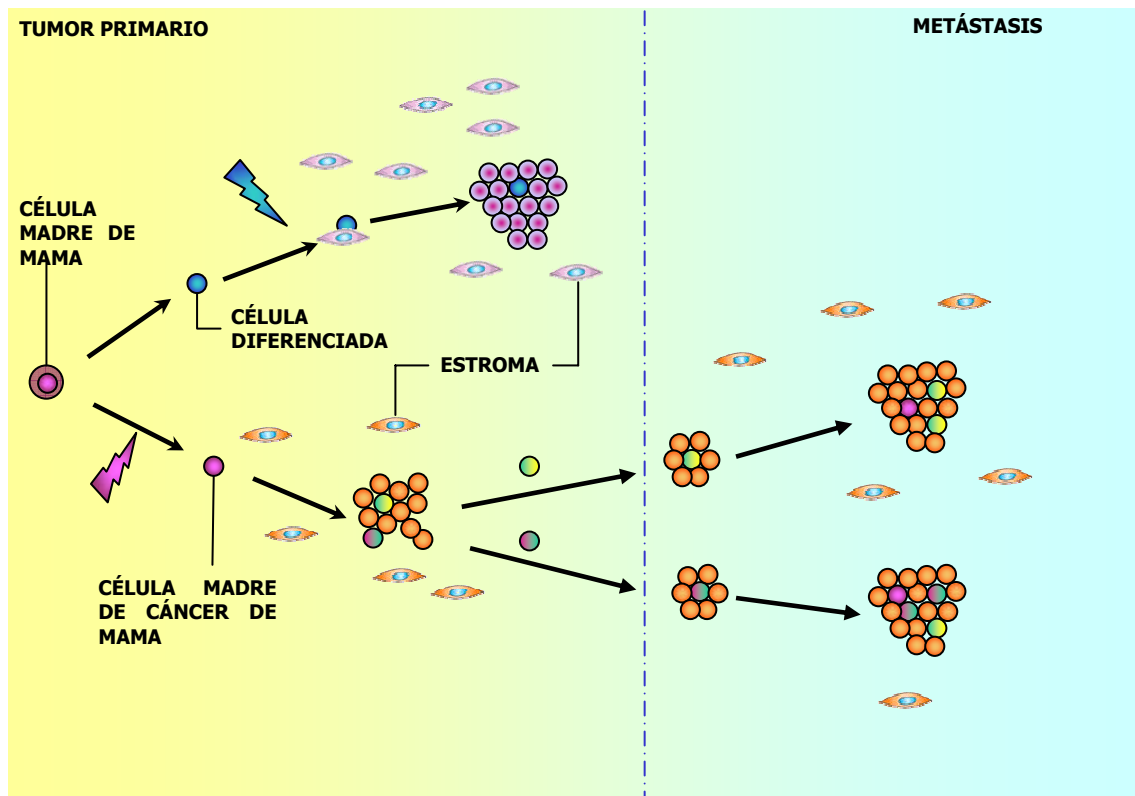


Figura 2: Modelo de proceso metastático sobre *stem cells*.

3. GANGLIO CENTINELA

Es el primer ganglio regional que recoge las células tumorales liberadas por el tumor a través del sistema linfático y a partir del cual se distribuye a otros ganglios y órganos. Se cree que el fenómeno de la metástasis ganglionar se produce antes que en otros órganos por dos motivos (Gendreau & Whalen, 1999):

- a. El ganglio actúa como un filtro eficaz de las células que llegan vía linfática desde el tumor.
- b. El ganglio, centro secundario de la respuesta inmune, provee de un ambiente que favorece la adhesión de las células tumorales en circulación. Algunas de las interacciones podrían promover la invasión y proliferación.

La forma habitual de examinar el estado ganglionar de la axila es mediante linfadenectomía o vaciado axilar. Con frecuencia se lleva a cabo durante el mismo acto quirúrgico de la tumorectomía, e implica el examen patológico de 10 a 30 ganglios linfáticos cuando se examinan tres niveles. Como consecuencia de la intervención se produce la interrupción del proceso normal de drenaje y una de las complicaciones más frecuentes es el linfedema crónico, que afecta a más del 10% de las pacientes. Por otra parte, si la disección axilar no alcanza el tercer nivel, el porcentaje de falsos negativos es del 3%.

El linfedema es una acumulación anormal de fluidos (edema) en los tejidos, con cambios secundarios como: inflamación crónica, engrosamiento y cicatrización del tejido conjuntivo. Esto ocasiona dolor, ardor, enrojecimiento e hinchazón. Los pacientes con linfedema son más propensos a las infecciones locales y suelen tener problemas de movilidad en la extremidad afectada. Aún no existe un tratamiento eficaz para los pacientes que sufren de linfedema crónico avanzado. El edema puede reaparecer más fácilmente en aquellos pacientes que han sufrido de linfedema.

El concepto de biopsia del ganglio centinela surgió con el objetivo de testar el estado axilar ganglionar sin retirar la mayoría de los ganglios. El ganglio centinela se define como el primer ganglio o ganglios que reciben el flujo linfático que drena desde el tumor primario. La localización de dicho ganglio(s) se realiza mediante la inyección de un coloide marcado, en la lesión primaria (Figura 3). La técnica del ganglio centinela reduce la morbilidad que produce la disección axilar completa en pacientes con ganglios negativos (N0). Si el ganglio centinela contiene células metastásicas, frecuentemente se realiza la disección axilar.

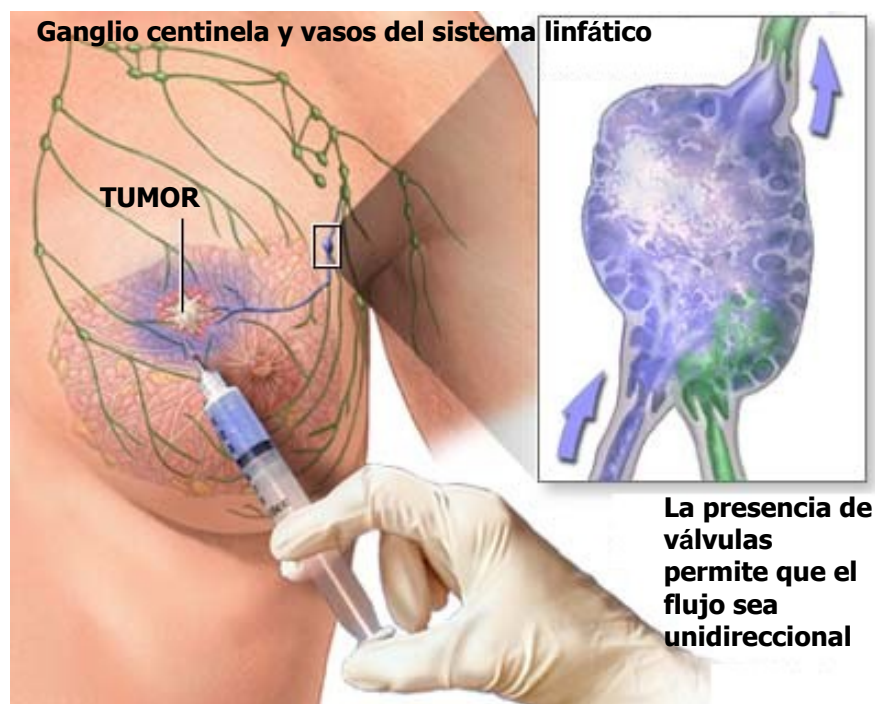


Figura 3: Dibujo esquemático de la inyección peritumoral y del flujo ganglionar unidireccional. (Adaptado de la Enciclopedia Ilustrada de Salud (Health Illustrated Encyclopedia) de A.D.A.M. © 1997-2007 A.D.A.M., Inc.)

Tras el inicio del tratamiento conservador, la biopsia del ganglio centinela ha sido uno de los avances más importantes en el tratamiento quirúrgico del cáncer de mama debido a la reducción de las complicaciones que provoca la linfanectomía, a la disminución de la duración del ingreso hospitalario y en que permite una indicación más precisa para el tratamiento en adyuvancia.

Un ganglio centinela negativo excluye la posibilidad de afectación en el resto de la axila, con un 95% de fiabilidad, lo que evita las linfadenectomías innecesarias en las pacientes pN0, aproximadamente cerca del 70% de las pacientes con cáncer de mama. Entre un 40-70 % de los pacientes, el ganglio centinela es el único ganglio positivo de la axila y el porcentaje de falsos negativos es inferior al 3%.

La información sobre la afectación ganglionar tiene incidencia directa en la supervivencia de las pacientes, un 40 % de las pacientes con ganglios positivos mantienen largos periodos libres de enfermedad gracias a los tratamientos en adyuvancia. Como contrapartida, entre el 20 y 30 % de las pacientes diagnosticadas con ganglios negativos presentan recidiva en torno a los 10 años (Devi et al., 2000; Fitzgibbons et al., 2000).

EXPRESIÓN DE CITOQUERATINAS

La expresión de marcadores epiteliales en células tumorales ha permitido la identificación de dichas células en otros tejidos, tales como sangre, médula ósea o ganglios linfáticos. El desarrollo de técnicas que detecten las células tumorales en circulación, antes de que se manifiesten las metastásis a distancia, podría ser útil para el pronóstico del paciente. El análisis de células tumorales aisladas empezó a finales de los años 80, y en la actualidad se detectan mediante el uso de la inmunohistoquímica y la PCR.

Las citoqueratinas son proteínas que forman parte de elementos estructurales del citoesqueleto de las células epiteliales (filamentos intermedios). Existen dos tipos de citoqueratinas, las de tipo ácido, tipo I (bajo peso molecular) y las de tipo básico o neutro, tipo II (elevado peso molecular). En humanos, existen 54 genes funcionales de queratina, formando dos *clusters* localizados en los cromosomas 17q21.2 y 12q13.13. Las citoqueratinas normalmente se asocian en dímeros que comprenden una citoqueratina de tipo I y II. Cada tipo celular epitelial expresa un repertorio determinado de citoqueratinas dependiendo del tipo de epitelio, del nivel de diferenciación y del estado de desarrollo. De esta forma, se pueden clasificar todos los epitelios en función de su perfil de expresión de citoqueratinas, este perfil se mantiene cuando un epitelio se transforma en carcinoma. Característica de gran implicación en el diagnóstico patológico.

En el citoplasma, los filamentos de queratina forman una red compleja que se extiende desde la superficie del núcleo a la membrana. Esta asociación tiene una importancia crucial para la organización del citoplasma y los mecanismos de comunicación celular.

Las citoqueratinas epiteliales de tipo I, comprenden los siguientes tipos según la nueva nomenclatura de consenso: KRT9, KRT10, KRT12, KRT13, KRT14, KRT15, KRT16, KRT17, KRT18, KRT19, KRT20, KRT23, KRT24 y KRT25. Su peso molecular varía entre los 40 kDa (KRT19) y los 64 kDa (KRT9) (Schweizer et al., 2006).

La citoqueratina 19 (KRT19) es un marcador clásico en la detección de enfermedad mínima residual. A diferencia de otros miembros de la misma familia, esta queratina no se asocia con citoqueratinas básicas en las células epiteliales. Se expresa específicamente en el peridermo, la capa superficial transitoria que envuelve la epidermis en desarrollo. Se expresa con frecuencia en células epiteliales en cultivo y en la mayoría de tumores epiteliales.

En el epitelio glandular mamario, se reconocen dos tipos celulares: el tipo celular glandular caracterizado por la expresión de las citoqueratinas 7, 8, 18 y 19 y las células mioepiteliales-basales que muestran expresión de KRT 5, 14 y 17. Dentro del compartimento luminal unas pocas células expresan KRT5/6 y son capaces de diferenciarse hacia el fenotipo glandular o basal (Figura 4). También existen poblaciones intermedias que expresan KRT 5/6 y 8, 18 y 19, indicando el proceso de diferenciación. Los patrones de expresión de las citoqueratinas durante la carcinogénesis están muy conservados.

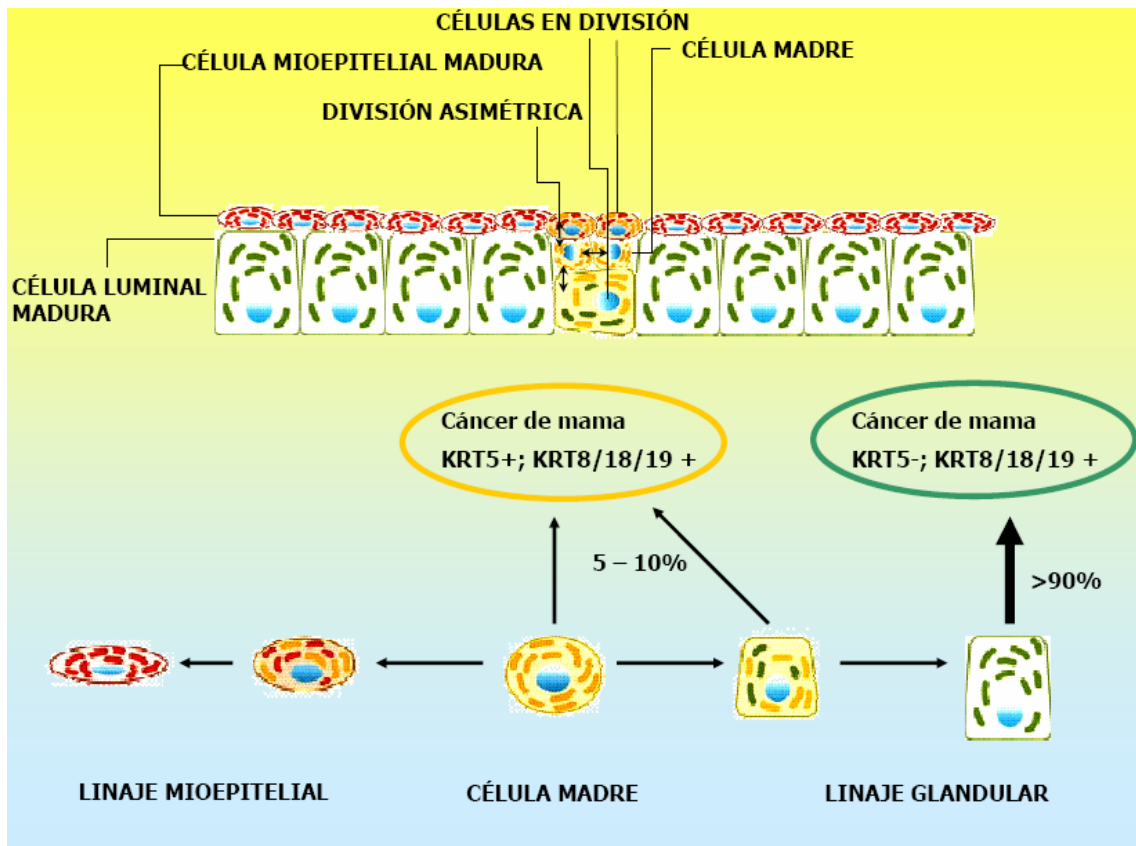


Figura 4: Diferenciación celular y expresión de citoqueratinas.

4. DIAGNÓSTICO

Las micrometástasis en ganglios linfáticos son depósitos microscópicos de células malignas, inferiores a 2 mm de diámetro. El significado clínico de la micrometástasis todavía no ha sido resuelto. Aunque algunos autores cuestionan la importancia de dichos depósitos, el análisis de series grandes de pacientes con largos seguimientos, indican una asociación entre la presencia de micrometástasis y peor pronóstico.

Existen tres aproximaciones a la localización de micrometástasis ganglionares: cortes seriados y H&E, inmunohistoquímica y RT-PCR.

La H&E es una técnica rutinaria en la detección de metástasis, pero los focos pequeños pueden no localizarse. Existe una recomendación reciente de examinar al menos tres secciones por ganglio para una detección apropiada.

En los ganglios linfáticos pueden detectarse las células epiteliales que provienen del tumor mediante el uso de anticuerpos específicos para determinadas citoqueratinas. La inmunohistoquímica muestra mayor sensibilidad que la H&E, siendo capaz de detectar 1 célula maligna entre cien mil linfocitos. Se ha demostrado correlación entre micrometástasis en ganglios y descenso en la supervivencia postoperatoria de pacientes con cáncer de mama, estudiadas mediante inmunohistoquímica.

El marcador ideal de mRNA debería expresarse a niveles elevados en el tejido tumoral y no hacerlo en los ganglios linfáticos normales pero, al contrario que en el melanoma para el cual se ha identificado un único marcador, la tirosinasa, la mayoría de marcadores utilizados hasta ahora en mama, se expresan a cierto nivel en ganglios normales. Permanece abierta por tanto la búsqueda de un marcador "ideal" o panel de marcadores que refleje la expresión de las células metastásicas en el ganglio centinela. Recientemente, se ha publicado los niveles de expresión de genes asociados a enfermedad metastásica en ganglios linfáticos y el resultado muestra un patrón particular de expresión, que concuerda con la naturaleza heterogénea del cáncer de mama.

Otro problema derivado de la extraordinaria sensibilidad de la técnica (una célula maligna entre un millón de linfocitos), dos órdenes de magnitud superior a la H&E y un orden respecto a la inmunohistoquímica, es que requiere una evaluación posterior de la positividad, ya que la técnica puede ser demasiado sensible para el uso clínico. Algunos autores han sugerido que la presencia de células individuales no resultan significativas clínicamente, mientras que las colonias de células, sí.

Estas críticas al uso de la RT-PCR como técnica de detección de micrometástasis, se están intentando resolver mediante el uso de termocicladores que utilizan un sistema de detección fluorescente que permite realizar un seguimiento *online* de la amplificación durante la fase exponencial.

La posibilidad de cuantificar los niveles de expresión, aunque sea de una forma relativa, permitirá establecer diferencias entre los niveles de expresión basales y los derivados de la progresión tumoral. Así como establecer cual es la carga metastásica mínima que confiere características de pronóstico.

4.1. DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO RUTINARIO

En la detección de metástasis en ganglios de pacientes con cáncer de mama, se ha evolucionado hacia el uso de técnicas más sensibles y fiables. El examen histológico o inmunohistoquímico directo del ganglio centinela detecta más metástasis que el examen patológico estándar de una disección axilar completa, debido a que se analiza un menor volumen tisular y la reducción de costes permite realizar técnicas más caras.

Las metástasis ocultas, por definición son depósitos tumorales que no se detectan en el examen inicial. Pueden estar presentes en el corte pero pasar desapercibidas durante el cribado o bien estar presentes en el bloque de parafina y no detectarse sino se realizan niveles adicionales. El empleo combinado de secciones seriadas y anticuerpos monoclonales contra proteínas epiteliales de superficie, tales como citoqueratinas, aumentan la detección

de metástasis ocultas, en particular de las micrometástasis (entre 0.2-2 mm) o de las células aisladas formando *clusters* (≤ 0.2 mm).

La detección de micrometástasis y células aisladas en el examen histológico de un ganglio depende de:

- a. Factores relacionados con la muestra.
- b. Factores relacionados con el cribado.

Entre los factores relacionados con la muestra, se incluyen los siguientes: porción del ganglio sometido a la evaluación histológica, grosor de las secciones, número de secciones e intervalos entre secciones histológicas o cantidad de secciones examinadas.

Entre los factores relacionados con el cribado se incluyen el tipo de tinción o inmunohistoquímica de rutina utilizada, el tamaño de la sección de tejido evaluada y los factores de tipo humano (difícilmente cuantificables, como la fatiga, la carga de trabajo, la distracción o la habilidad).

Con secciones de aproximadamente 2 mm de grosor, existen pocas posibilidades de no localizar macrometástasis cuando se estudia sólo una sección de la superficie del bloque, aunque puede ser que la dimensión máxima de la macrometástasis no quede reflejada en la sección. Sin embargo, un estudio fidedigno de células aisladas en un ganglio, resultaría costo-efectivo inviable, ya que requeriría aproximadamente 200 IHQ por ganglio (Weaver, 2003).

La detección de micrometástasis depende de su tamaño y frecuencia, del azar estadístico, del número de niveles adicionales examinados y del intervalo entre niveles (Weaver, 2005).

Aproximadamente un 25% de los ganglios negativos clínicamente (N0), tendrán metástasis detectadas mediante examen rutinario histopatológico. Esta proporción aumenta al 27-28% cuando se estudia el ganglio centinela y se realiza H&E sobre cortes finos.

Cuando se realizan más cortes y se utiliza la IHQ, las metástasis pueden ser localizadas en un 10% más de los casos. El porcentaje global de positividad es aproximadamente del 40% (Krag & Weaver, 2002).

El riesgo de enfermedad residual en el resto de la axila es proporcional al tamaño de la metástasis detectada en el ganglio centinela. Un ganglio negativo comporta un riesgo que equivale a la tasa de falsos negativos, (3-10%), dependiendo de los estudios. Las ITCs, conlleva un riesgo del 12-14%, las micrometástasis del 20-35% y las macrometástasis del 50% (McCready et al., 2004; Viale et al., 2001).

El tamaño de cualquier metástasis oculta en un bloque de parafina, es directamente proporcional al grosor del bloque que queda por examinar, los intervalos entre secciones determinan el tamaño de cualquier metástasis no detectada (Figura 5)(Weaver, 2005).

El uso de la IHQ aumenta la detección de pequeños depósitos, su función principal es confirmar la sospecha de malignidad al aumentar la sensibilidad de detección, también es útil para diferenciar células névicas benignas de la cápsula del ganglio, de inclusiones malignas (Gadaleanu & Muresan, 1984). Posibles errores en el uso de la IHQ, incluyen inclusiones benignas epiteliales poco frecuentes (Maiorano et al., 2003), tinción positiva por parte de las células dendríticas reticulares, falsos positivos producidos por la tinción de macrófagos (no se deberían confundir con células tumorales aisladas, nunca), artefactos provocados por precipitación no asociados a ninguna estructura biológica, etc. (Cserni, 2006).

En ocasiones el tamaño potencial de metástasis ocultas en el tejido no examinado podría superar el tamaño de las micrometástasis detectadas por IHQ.

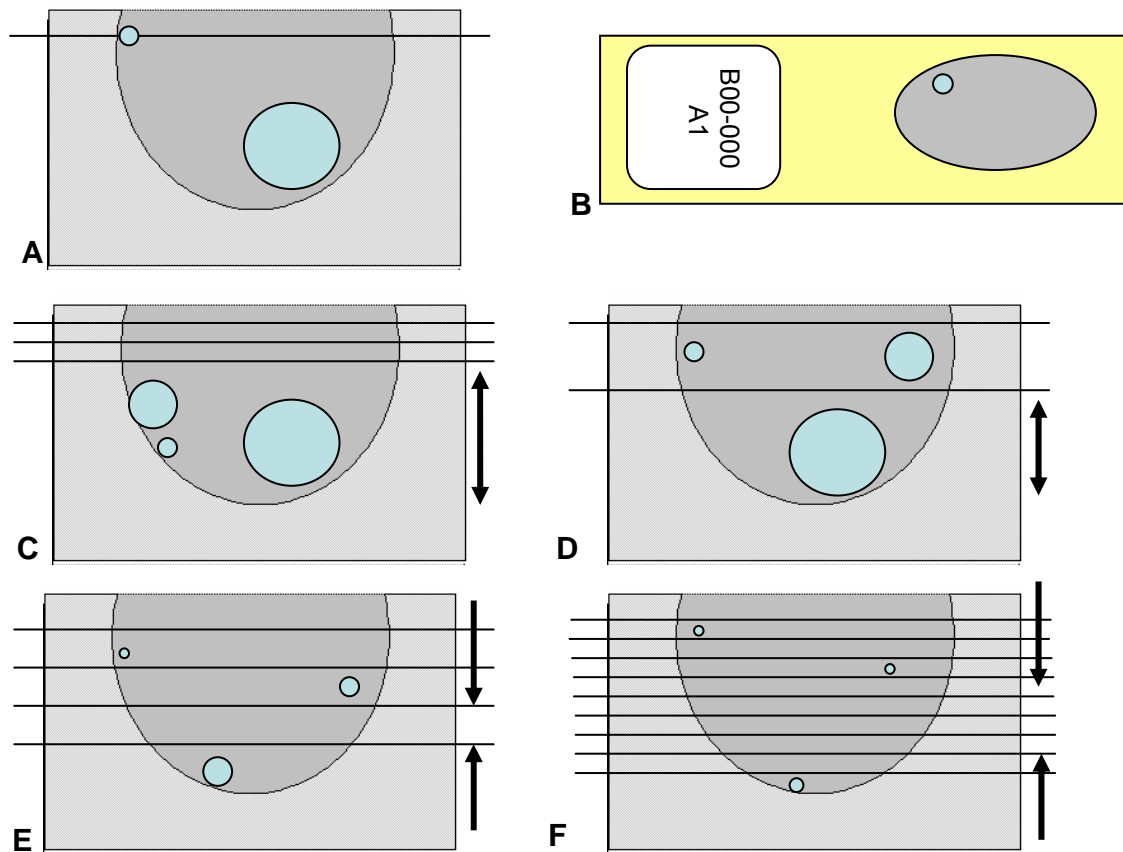


Figura 5: Algunos patrones de error en la identificación de micrometástasis utilizando diferentes estrategias de corte.

A, C-F Secciones transversales de 2 mm de grosor que contienen la mitad de un ganglio. Las líneas indican donde la sección de tejido se monta sobre la superficie del porta. A. Sección única de la superficie del bloque de parafina, identifica un cluster de células tumorales, pero pierde una micrometástasis que se haya a más profundidad. B, Laminilla que resulta de montar la sección (A). C, tres niveles separados por 200 μ m, esta estrategia que explota la superficie del bloque, mientras que los niveles más profundos quedan sin explorar. El tamaño de la micrometástasis mayor es igual al grosor del bloque no examinado (doble-flecha). D, 2 niveles separados por 1 mm, aunque sólo se examinan 2 secciones la pérdida de información es menor que el caso C. E, 4 niveles separados por 0.5 mm. F. Múltiples niveles separados por 0.2 mm a través del bloque. Es una estrategia diseñada para detectar todas las metastasis > 0.2 mm. Las ITCs podrían ser detectadas o perdidas por cuestión de azar.

4.2. DIAGNÓSTICO MOLECULAR

La técnica de la PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa) creada en 1983 por Kary Mullis, es la herramienta reciente de mayor impacto en el campo de la biología molecular. Ha influenciado todos los aspectos de la investigación médica tanto en su vertiente básica como aplicada, desde los estudios de regulación génica hasta el diagnóstico de enfermedades infecciosas, neoplasias, o enfermedades de tipo hereditario (Ma, 1995). En los últimos años se ha aplicado las técnicas de biología molecular en la detección ganglionar de micrometástasis. La técnica de la RT-PCR ha demostrado ser una técnica más sensible y coste-efectiva que los cortes seriados y la inmunohistoquímica. La sensibilidad de la técnica inmunohistoquímica, le permite detectar una célula tumoral entre 10^4 a 10^5 células normales de médula ósea (Ellis et al., 1989; Osborne et al., 1991), mientras que la técnica de la RT-PCR, demuestra una sensibilidad superior, al ser capaz de detectar una célula tumoral entre 10^6 células normales mononucleares de sangre periférica (Schoenfeld et al., 1996).

Los inconvenientes principales del análisis mediante RT-PCR convencional es que el análisis del resultado sobre el producto final depende del número de ciclos de amplificación y se pueden producir falsos positivos (Bostick et al., 1998a), influenciados por:

1. **Transcripción ilegítima** (bajo nivel de transcripción). La transcripción génica se considera un proceso bajo control estricto, en el que sólo los genes requeridos por las células o tejidos se expresan. Se ha comprobado que genes específicos de determinados tejidos, se pueden expresar de forma no específica, este tipo de expresión ectópica, se denomina *ilegitima*, y produce a nivel basal la transcripción debido a la presencia de factores de transcripción ubicuos y/o el balance neto de factores reguladores (Chelly et al., 1989). Además se ha sugerido que en eucariotas superiores el inicio de la transcripción ocurre con poca frecuencia y el proceso está regulado de forma probabilística, permitiendo la expresión de cualquier gen de forma variable (Hume, 2000).

2. **Contaminación.** Por contaminación de células durante la obtención de las muestras (Zippelius et al., 1997).

3. **Pseudogenes.** Se tratan de copias de un gen que carecen normalmente de intrones y de otras secuencias de ADN esenciales para su función; los pseudogenes, aunque son genéticamente similares al gen funcional original, no se expresan y frecuentemente contienen numerosas mutaciones. De modo que al amplificar un gen mediante PCR se puede amplificar simultáneamente un pseudogén (Ruud et al., 1999).

Desde las primeras aplicaciones de la PCR en el estudio de micrometástasis en ganglios de pacientes afectados de cáncer de mama o en el estudio de enfermedad mínima residual en pacientes de leucemia mieloide crónica (LMC), surgió la necesidad de transformar la técnica de características cualitativas, en cuantitativa con la intención de correlacionar la carga tumoral con la técnica inmunohistoquímica. En el caso del seguimiento de pacientes con LMC, la cuantificación permitía evaluar la evolución del paciente y la respuesta al tratamiento. Mediante la técnica cuantitativa se podría establecer un límite de expresión que podríamos considerar mínimo, transcripción ilegítima sin características diagnósticas.

4.2.1. RT-PCR Real-Time

El *Northern Blot*, es un método clásico que podría considerarse el *gold standard* para la cuantificación de un mRNA específico, pero no resulta útil en la práctica clínica ya que se necesita una gran cantidad de mRNA y de tiempo. Con el desarrollo de la PCR se intentaron otras aproximaciones que resultaran más prácticas, como la RT-PCR competitiva, pero también resultaba técnicamente laboriosa, requería la construcción de un *standard* competidor y podía acumular errores, debido al gran número de manipulaciones que implicaba (Freeman et al., 1999).

Una de las principales limitaciones de la RT-PCR estándar, es que generaba la misma cantidad de producto final partiendo de cantidades muy diferentes de ácido nucleico, ya que el

resultado se realiza sobre la fase de saturación. Esta limitación fue resuelta por Higuchi en 1992, con el desarrollo de la PCR en tiempo real (Higuchi et al., 1992).

Se trata de termocicladores que monitorizan la reacción mediante el uso de agentes intercalantes fluorocromos o sondas que se incorporan a medida que el producto amplificado se genera, lo que permite analizar la reacción durante la fase exponencial, cuando los reactivos están en exceso y no se han producido productos inhibidores de la reacción. El hecho de monitorizar la cinética de la reacción permite obviar el análisis sobre el producto final, disminuye el tiempo de reacción y evita la manipulación de agentes tóxicos como la acrilamida o el bromuro de etidio.

4.2.2. MONITORIZACIÓN DE LA PCR REAL-TIME

La PCR *RealTime*, precisa un marcador fluorescente (Tabla 2) que se una al producto amplificado en cada ciclo y que sea un registro de la cantidad formada. En los primeros ciclos, la señal emitida es débil y no se distingue del fondo. A medida que se va sintetizando nuevo producto, la señal alcanza un crecimiento exponencial, llegando a saturarse. Los motivos de saturación de la reacción son varios el agotamiento de algún reactivo esencial como los *primers*, los dNTPs, el fluorocromo o la polimerasa. La información que suministra el punto final de la reacción no nos revela la cantidad inicial de cDNA de partida. Las diferencias en las concentraciones iniciales de partida quedan reflejadas al comparar el número de ciclos que requiere la reacción para alcanzar un nivel de fluorescencia significativo, umbral (*threshold level*). El número de ciclos necesarios para superar dicho umbral se denomina Ct o CP (*threshold cycle* o *crossing point*, respectivamente) dependiendo de la plataforma.

Los diferentes *softwares* que incorporan los termocicladores poseen distintos algoritmos para calcular el umbral, y en algunos esta observación puede ser realizada manualmente. Los métodos más frecuentes y fiables para calcular los Cts o CPs, son:

1. Método de Regresión de Ajuste de Puntos (*Fit Points*) y Método del Ciclo Umbral (*Threshold*). Determinan el CP a un nivel de fluorescencia constante. Este método asume que todas las muestras tienen la misma cantidad de cDNA a un

nivel de fluorescencia umbral. En el método de los *Fit Points*, el usuario ajusta la curva exponencial de una muestra a una recta (Figura 6). Permite localizar el nivel umbral en la fase exponencial y reduce inexactitudes leves al agregar datos a partir de varios puntos. Se obtiene al dibujar una línea paralela al eje de las x en la región de la curva donde la fluorescencia se ajusta a una recta de regresión logarítmica. Es dependiente del usuario, le obliga a marcar una barrera que excluya los puntos no informativos de la fluorescencia de fondo. La intersección de la recta de regresión con la línea de fondo nos da el valor de CP. Estos métodos son muy fiables, pero poseen la desventaja de que no son fácilmente automatizables, y necesitan la interacción del usuario. Un problema adicional, es que se asume una fluorescencia de fondo constante para todas las muestras dentro de un mismo experimento, con objeto de reflejar las diferencias entre muestras se desarrollan otros algoritmos, como el método de la segunda derivada.

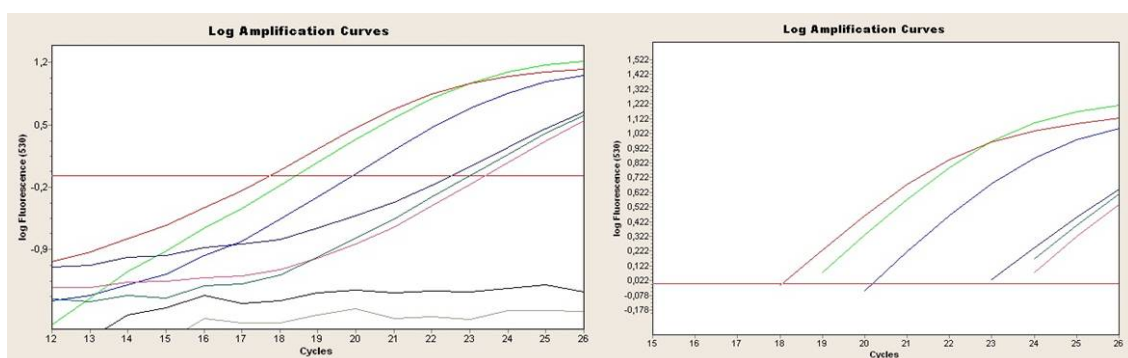


Figura 6: Método de Regresión de Ajuste de Puntos (*Fit Points*). Ajuste de las curvas exponenciales a una recta (umbral).

2. Método de la Segunda Derivada. Elimina la interacción del usuario durante la selección del umbral y la sustracción de la línea de fondo. Es el máximo de la segunda derivada de la curva de intensidad de fluorescencia, o sea corresponde al punto de la fase exponencial donde la intensidad de la fluorescencia crece al ritmo más rápido (Figura 7). Este incremento o aceleración de la señal de fluorescencia disminuye cuando la reacción entra en la fase de saturación o *plateau*. El ciclo donde la 2ª derivada es máxima, está localizado en la región central de la recta de regresión logarítmica. Las cinéticas de fluorescencia para

cada una de las muestras es diferente. Las diferentes curvas exhiben cinéticas variables, con una fluorescencia de fondo (1ª fase), un crecimiento lineal y exponencial (2ª y 3ª fase), y finalmente valores de saturación (4ª fase). El ciclo donde la aceleración de la señal de fluorescencia es máxima es siempre entre la fase 2 y la 3, y decrece a partir de ésta última.

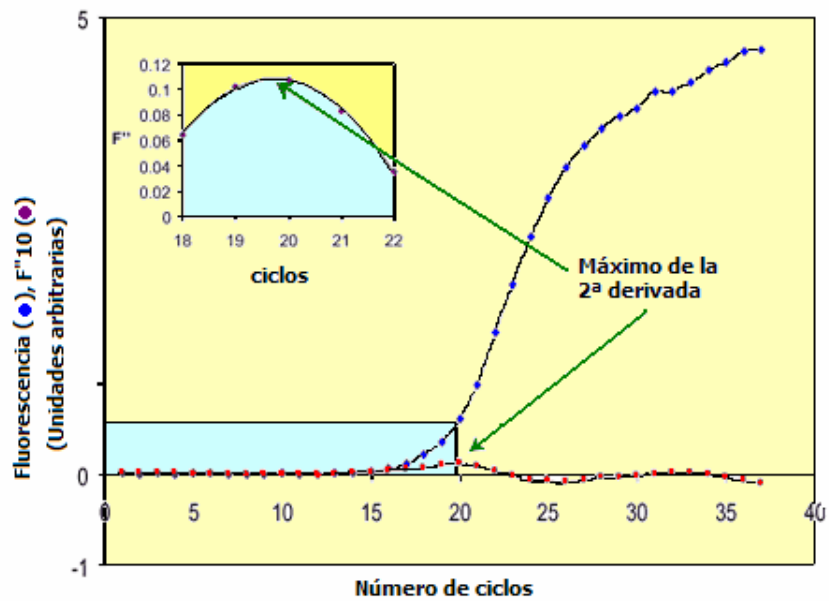


Figura 7: Método de la Segunda Derivada.

4.2.3. AGENTES INTERCALANTES

Los agentes intercalantes, son fluorocromos que se unen a la doble cadena del producto amplificado, emitiendo fluorescencia. El agente intercalante más utilizado con los termocicladores *Real-Time* es el *Sybr Green*, se cree que se une al surco menor de la doble cadena de DNA. La principal ventaja es que resulta fácil optimizar las reacciones con *Sybr Green* y es más económico que las sondas. El inconveniente es que se une a dímeros de *primers* o productos inespecíficos de la reacción. Esto requiere adoptar precauciones especiales. Por tanto, la mayoría de los protocolos que usan esta aproximación requieren un análisis de "curva de *melting*", con el fin de identificar el producto amplificado que ha sido detectado, ya que las curvas de *melting* son un reflejo de la T_m (temperatura de *melting*).

La T_m es característica del producto amplificado, ya que depende de su composición, exhibiendo los dímeros de *primers* curvas de *melting* con T_m s mucho más bajas que el producto amplificado. Por lo que se puede programar la adquisición de fluorescencia a una determinada temperatura, que no coincida con la temperatura de *melting* de los productos inespecíficos (Figura 8).

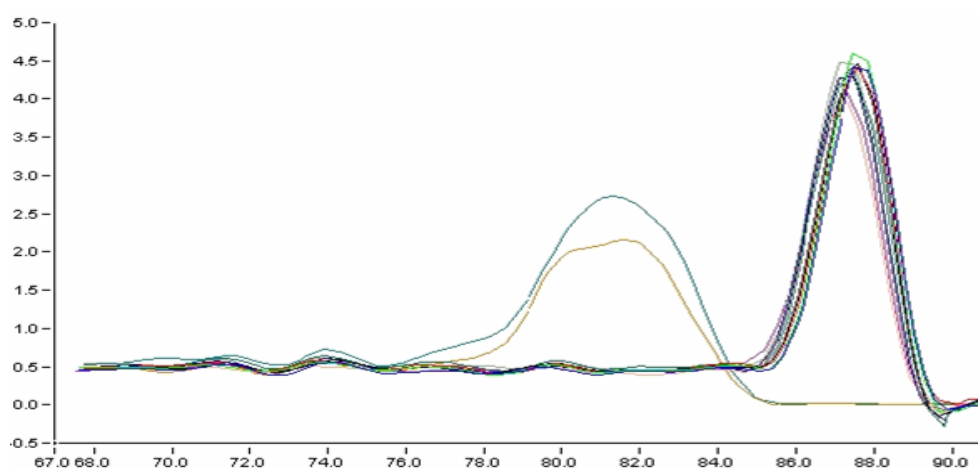


Figura 8 Curvas de *melting* características del producto amplificado y de la formación de dímeros de *primers*.

4.2.4. SONDAS DE HIBRIDACIÓN ESPECÍFICAS

Son sondas marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donante y un aceptor. El proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia entre dos moléculas. Las sondas son secuencias complementarias a una región del producto que se desea amplificar, las sondas utilizadas con mayor frecuencia son las siguientes:

- Sondas *Taqman* (Sondas de Hidrólisis)
- *Molecular Beacons*
- Sondas FRET (Sondas de Hibridación)

En las sondas *TaqMan*, la sonda presenta un fluorocromo unido en el extremo 5' ó *reporter* (FAMTM, TETTM o VICTM) y otro unido en el extremo 3' ó *quencher* (TAMRATM). Durante el proceso de desnaturalización la sonda no se une a la diana, cuando se alcanza las temperaturas de hibridación, los *primers* y la sonda se unen a las secuencias complementarias en el DNA, la fluorescencia emitida por el *reporter* es absorbida por el *quencher* mediante un proceso conocido como energía de transferencia de Förster (Förster, 1948). La síntesis de DNA produce un desplazamiento e hidrólisis de la sonda por parte de la polimerasa, lo que produce que el *reporter* emita una señal fluorescente que no es captada por el *quencher*, y por lo tanto es registrada por el termociclador.

La separación de la sonda del DNA posibilita que el proceso de extensión del primer continúe hasta el final. Este proceso se repite en cada ciclo de la PCR, dando lugar a un incremento en la intensidad de la fluorescencia proporcional a la cantidad de producto generado.

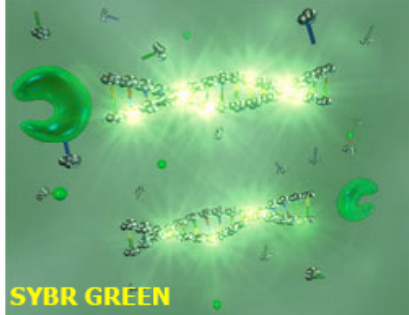

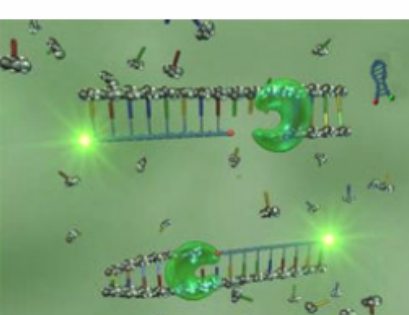
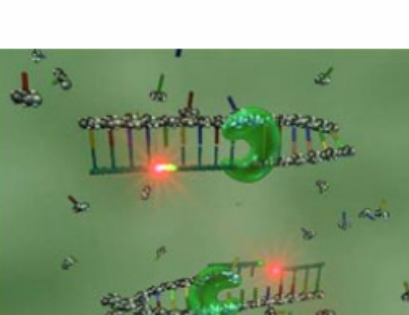
Otro tipo de sondas TaqMan lo constituyen las sondas TaqMan MGB. A diferencia de las sondas convencionales, éstas presentan un segundo *quencher* no fluorescente en el extremo 3' e incorporan además en este mismo extremo un grupo MGB (*Minor Groove Binder*). La función de este grupo es aumentar la temperatura de fusión (T_m) de la sonda, permitiendo así el empleo de sondas cortas. Son menos caras de producir, y tienen menor fluorescencia de fondo.

Los *Molecular Beacons* son sondas que forman una estructura secundaria en forma de horquilla, que presentan en los dos extremos de los brazos, el *quencher* en el extremo 3' y el *reporter* en el 5'. Cuando la sonda no está hibridada, la estructura de horquilla, mantiene el *reporter* y el *quencher*, próximos, lo que evita la emisión de fluorescencia. Cuando la sonda hibrida, la estructura se abre y la señal fluorescente se emite.

En las sondas FRET, el sistema consiste en dos sondas que se unen a secuencias próximas en el DNA, una de ellas lleva un donante de fluorescencia en el extremo 3' y la otra un fluoróforo aceptor en el extremo 5', cuando las sondas están hibridadas, la proximidad del donante y del receptor provoca transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET), y se emite luz fluorescente roja.

Además de los tipos mencionados anteriormente, existen otros tipos de sondas que se utilizan menos frecuentemente: Escorpiones, *Primers Sunrise*TM y *Primers fluorogénicos LUX*TM. Los principales agentes intercalantes y tipos de sondas quedan recogidos en la siguiente tabla (Tabla 2).

Tabla 2: Principales tipos de agentes intercalantes y sondas utilizados en la *Real Time PCR*.

QUÍMICA	VENTAJAS	INCONVENIENTES
 <p>SYBR GREEN</p>	<p>Utilidad en reacciones simples.</p> <p>Herramienta esencial para la optimización de parejas de <i>primers</i> cuando se utiliza combinado con el análisis por curvas de <i>melting</i>.</p>	<p>Detección de amplificación no específica.</p>
 <p>SONDAS TAQMAN</p>	<p>Detecta sólo producto amplificado específicamente.</p> <p>Utiliza protocolos estándar de PCR.</p> <p>La hibridación e hidrólisis no interfieren con la acumulación del producto.</p>	<p>Requiere que se generen sondas específicas para cada diana.</p> <p>No puede existir G en el extremo 5' (bloquea la hidrólisis).</p>
 <p>MOLECULAR BEACONS</p>	<p>Puede fácilmente detectar diferencias en un solo nucleótido.</p> <p>Necesita hibridar completamente con la diana para liberar la señal.</p> <p>Puede utilizarse en ensayos no basados en la amplificación por PCR.</p>	<p>Requiere optimización y diseño estricto de la sonda.</p> <p>Requiere protocolos precisos de desnaturalización para evitar interferencias con la hibridación.</p>
 <p>SONDAS FRET</p>	<p>Alto grado de especificidad.</p> <p>Flexibilidad en el diseño de sondas.</p> <p>Fluorescencia reversible permite la generación de curvas de <i>melting</i>.</p>	<p>Requiere estricta optimización del diseño de las sondas.</p> <p>Más caro que otros métodos.</p>

4.2.5. CUANTIFICACIÓN RELATIVA

Existen dos aproximaciones a la cuantificación mediante plataformas *Real-Time*, la cuantificación absoluta o relativa. La cuantificación absoluta requiere utilizar una serie de diluciones de estándares de concentración conocida para generar una recta patrón. La generación de un estándar, DNA o RNA recombinante, es laborioso y necesita ser cuantificado con precisión.

La cuantificación relativa determina los cambios en los niveles de mRNA de un gen y los expresa con relación a los niveles de un control interno de RNA. Este gen de referencia, *housekeeping*, puede ser coamplificado en el mismo tubo (reacción *multiplex*) o no. La cuantificación relativa no requiere la fabricación de un estándar de concentración conocida y es una manera adecuada de estudiar los cambios fisiológicos en los niveles de expresión génica.

Para calcular los niveles de expresión normalizados de un gen determinado se han propuesto diferentes modelos matemáticos, existen modelos que tienen en cuenta la eficiencia de la PCR y otros que no añaden este factor de corrección.

Para obtener resultados precisos y reproducibles, sería deseable que la reacción tuviera una eficiencia próxima al 100%. Con esta eficiencia se duplica el producto amplificado, durante la fase exponencial. La eficiencia de la PCR tiene un gran impacto en la precisión del cálculo de la expresión y está influenciada por muchos factores, los que implican el diseño experimental como: el tamaño del amplicón, el contenido en GC y estructuras secundarias, factores relacionados con la dinámica de la reacción como concentraciones de los reactivos, y otros factores que implican desde el estado de la muestra al tipo de marcador fluorescente, o tipo de plataforma *Real-time* (Figura 9).

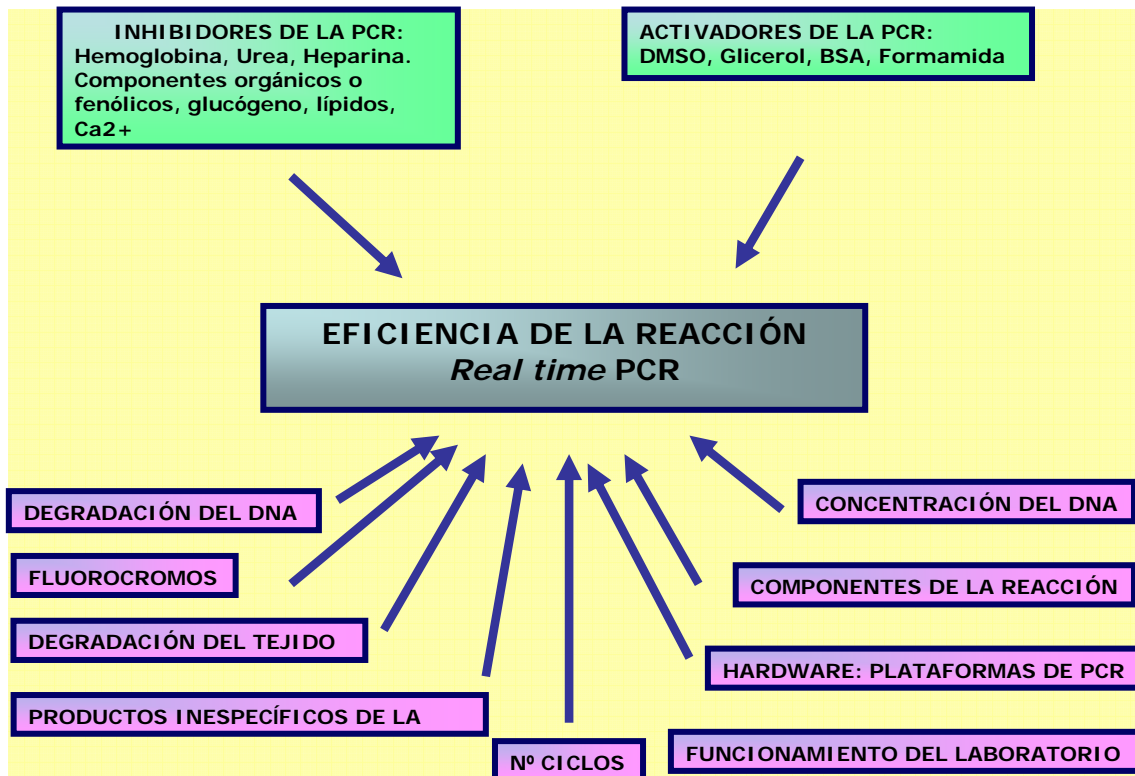


Figura 9: Principales factores que influyen en la eficiencia de la reacción de PCR.

La evaluación de la eficiencia es un punto fundamental en el procedimiento de cuantificación. Una eficiencia de amplificación constante es un criterio importante para la comparación de muestras. En las ocasiones que se emplea la normalización con genes *housekeeping*, se requiere una eficiencia de amplificación similar, entre gen diana y *standard*, pero este hecho se suele obviar, por lo que se sugiere que se utilicen formulas con este factor de corrección, ya que pequeñas diferencias en las eficiencias de amplificación del gen de estudio y del de referencia, generan falsos ratios de expresión. Por ejemplo: una diferencia del 3% entre las eficiencias de ambos genes provoca ratios diferencias en los ratios del 47%, si la $E_{\text{estudio}} < E_{\text{referencia}}$, y del 209% si $E_{\text{estudio}} > E_{\text{referencia}}$, después de 25 ciclos. A medida que aumentan las diferencias entre E, también aumenta el error en los ratios.

Existen varios métodos para calcular la eficiencia de una reacción, a continuación mencionaremos dos:

1. Estimación a través de la pendiente de una recta patrón, vía clásica (Figura 10). Se basa en los valores Ct de una serie de muestras de concentración conocida, a partir de las siguientes ecuaciones:

Amplificación fase exponencial = $10^{(-1/pendiente)}$

Eficiencia = $[10^{(-1/pendiente)}]-1$

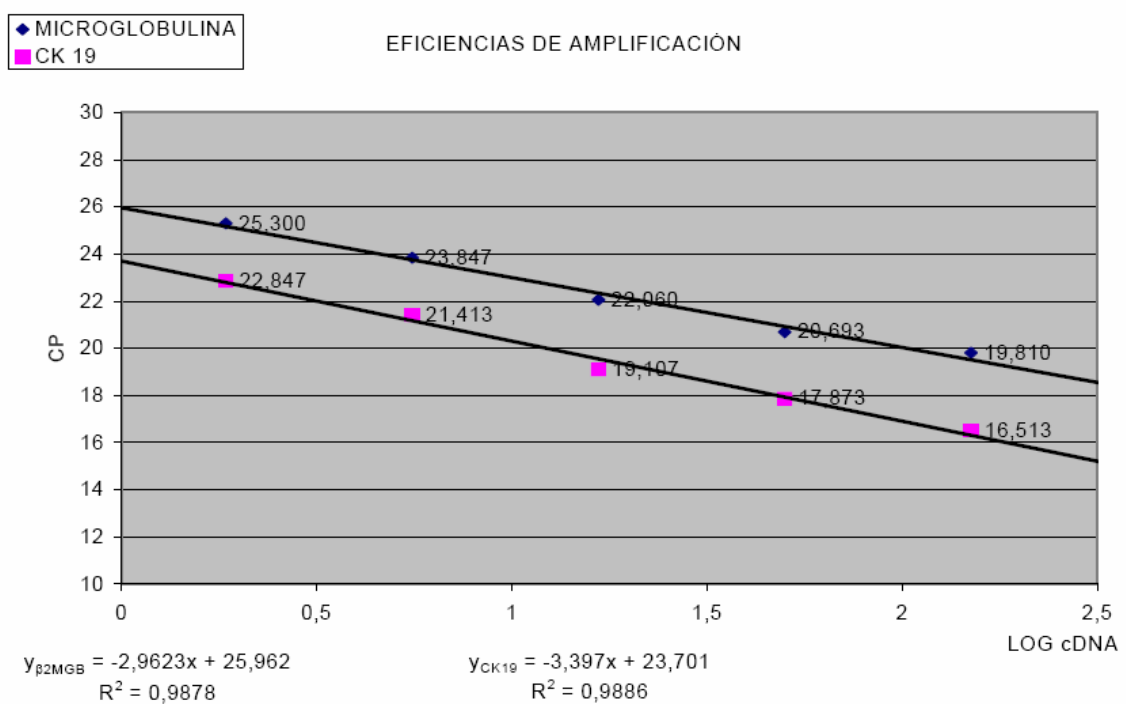


Figura 10: Cálculo de la eficiencia de la reacción a partir de la gráfica de las rectas patrón.

2. Estimación a través de incrementos en la fluorescencia absoluta (ventana de linealidad) (Ramakers et al., 2003). Alternativa basada en la linealización de la fórmula para la amplificación durante la fase exponencial.

$N_c = N_0 \times E^C \longrightarrow \text{Log}(N_c) = \text{Log}(N_0) + \text{Log}(E^C) \times C$

N_c : medida de fluorescencia
 N_0 : cantidad de producto inicial
E: eficiencia
C: número de ciclo

La parte lineal-logarítmica para cada muestra, puede determinarse marcando un límite superior e inferior, "ventana de linealidad" (Figura 11). Se utiliza la regresión lineal, para calcular la recta que más se ajusta dentro de los intervalos marcados, la intersección y la pendiente de la recta, son $\text{Log}(N_0)$ y $\text{Log}(E^C)$ respectivamente. La concentración inicial de partida surge directamente del valor de intersección de la recta de regresión ($N_0 = 10^{\text{intersección}}$), y está expresada en términos de fluorescencia. La eficiencia de cada muestra ($E = 10^{\text{pendiente}}$), se puede utilizar para comprobar la calidad de las muestras, y excluir aquellas que no son idóneas.

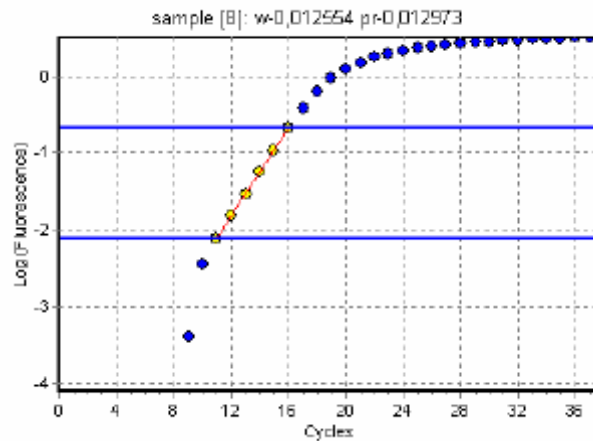


Figura 11: Cálculo de la eficiencia individual de una muestra, utilizando la regresión lineal.

4.2.6. NORMALIZACIÓN

La normalización de los datos introduciendo un control endógeno, tienen como objetivo corregir las variaciones en la eficiencia de la reacción entre muestras y los errores en la cuantificación de la muestra individual.

Los errores específicos en la *Real-Time* RT-PCR en la cuantificación de mRNAs se correlacionan con cualquier variación entre las muestras, en la cantidad y calidad del material de partida, variaciones en la integridad del RNA, en la eficiencia de la RT y en variaciones en la carga de cDNA. La normalización se utiliza para compensar las variaciones intra e intercinéticas de la RT-PCR (variaciones entre muestras y variaciones entre experimentos). La normalización se puede llevar a cabo frente a un gen control, no regulado o bien frente al contenido total de

RNA de la célula. La normalización frente al contenido total de RNA, es un método poco fiable. Requiere una cuantificación muy precisa mediante espectrofotómetro, *Agilent Bioanalyser* o *RiboGreen RNA Quantification Kit*. También se ha sugerido la normalización a través del contenido en rRNA, pero parece ser que estudios posteriores ponen en duda su utilidad.

Para normalizar los valores mediante un gen de referencia, se requiere analizar todas las muestras respecto al gen control de elección y calcular la abundancia relativa de dicho gen control y del gen objetivo del estudio. Para cada muestra la abundancia relativa del gen diana queda normalizada al ser dividido por la abundancia del gen control y los valores normalizados de las diferentes muestras pueden ser comparados.

Una cuestión no resuelta es ¿qué gen de referencia resulta adecuado para cada diseño experimental y tejido estudiado?

Idealmente las condiciones experimentales no deberían influir en la expresión de los genes control. Existen varios genes *housekeeping*, que se han utilizado para validar estudios de PCR: histona 3.3, β -actina, β 2-microglobulina, gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), RNA ribosomal 18S, bcr, abl y porfobilinógeno deaminasa (PBGD), entre otros. Se ha comprobado que algunos de ellos poseen varios pseudogenes procesados, el tamaño amplificado del producto de cDNA o del pseudogen puede ser el mismo. Además, en algunos, los niveles de expresión son muy elevados, por lo que incluso pueden dar una fuerte señal de amplificación partiendo de pequeñas cantidades, y en el caso de normalizar genes que se expresan a muy bajo nivel, inducir a error. En otras ocasiones el gen control muestra sobreexpresión en las muestras tumorales frente al componente normal o en otros casos dependiendo de las condiciones experimentales de del tipo de muestra existe variabilidad.

MATERIAL Y MÉTODOS

II. MATERIALES Y MÉTODOS

En marzo de 1998, dentro de la UFM (ICO) y el HUB (Hospital Universitari de Bellvitge) se inició la técnica del ganglio centinela, a través del ganglio centinela de estudio.

La curva de aprendizaje durante el periodo comprendido entre 1998 y 2001 con 284 casos, permitió establecer la tasa de no localizaciones y de falsos negativos de la técnica. En tumores de tamaño ≤ 20 mm la tasa de falsos negativos se encontraba en el 4%, mientras que en tumores de >20 mm aumenta al 11%. El porcentaje de no localización del ganglio centinela durante la curva de aprendizaje, osciló entre el 9 y el 23%.

Entre junio del 2000 y noviembre del 2006, 795 pacientes con cáncer de mama, fueron diagnosticadas en la UFM mediante mamografía, ecografía, PAAF y/o BAG, sin evidencia clínica de metástasis axilares, con tumores de baja probabilidad de afectación ganglionar axilar. Se consideran pertenecientes a este grupo (según protocolo de la institución año 2000) a pacientes con tumores de diámetro máximo inferior a 20 mm; a pacientes con tumores de diámetro máximo inferior a 30 mm de tipo lobulillar infiltrante (excepción pleomórficos), los cribiformes infiltrantes, los tumores infiltrantes de grado I, o los de grado II con receptores hormonales positivos y factor de proliferación inferior a 10; y de cualquier tamaño los tipos histológicos como el carcinoma tubular, coloide, papilar y adenoide quístico.

En la tabla siguiente se recogen las características anteriormente mencionadas (Tabla 3).

Tabla 3: Tamaños y tipos histológicos de los tumores infiltrantes con baja probabilidad de afectación ganglionar.

TUMORES CON BAJA PROBABILIDAD DE AFECTACIÓN GANGLIONAR

Tumor \leq 20 mm (T1 N0)

Tumor \leq 30 mm

- Lobulillar infiltrante (excepción variante pleomórfica)
- Cribriforme infiltrante
- Carcinoma grado I
- Carcinoma grado II, RE+, RP+ y Ki67 < 10%

Histología de bajo potencial de malignidad (cualquier tamaño)

- Carcinoma tubular
 - Carcinoma coloide
 - Carcinoma papilar
 - Carcinoma adenoide quístico
-

Las pacientes fueron operadas en el Hospital Universitario de Bellvitge (HUB). Se realizó tumorectomía y ganglio centinela. Se utilizó nanocoloide de albúmina marcado con 3 mCi (111MBq) de ^{99m}Tc (SOLCO[®]NANOCOLL, Amersham-Health) suministrado mediante administración peritumoral. La adquisición gammagráfica de imágenes se realizó entre los 90 y 120 minutos de la inyección del radiofármaco. Se utilizó una gammacámara SMV DSX equipada con un colimador. El tiempo de adquisición fue de 300 segundos/imagen. Se consideró como GC la presencia de uno o varios depósitos de radiotrazador localizados en la región del drenaje linfático tumoral. En las pacientes con tumor palpable la detección quirúrgica del GC tuvo lugar entre las 18-24 h de la detección gammagráfica. En las pacientes con tumor no palpable, se realizó a las 4 h de la linfogammagrafía. Una vez finalizada la tumorectomía, se procedió a la localización y biopsia del GC.

La serie incluye pacientes con tumores que no cumplen las condiciones mencionadas anteriormente:

- Pacientes con linfadenectomía posterior (como parte de la curva de aprendizaje)

- Pacientes con sospecha citológica de "atipias" sobre las que se realizó la técnica del ganglio centinela en previsión de malignidad en el diagnóstico definitivo (grupo control negativo).
- Carcinomas in situ y microinvasivos, 87 casos.

Las principales contraindicaciones, en el momento del estudio eran las siguientes:

- Cirugía previa que halla podido modificar el drenaje natural del tumor (tumorectomía previa, cirugía reductora...etc.).
- Multifocalidad extensa del tumor que supera un cuadrante.
- Cirugía axilar previa.
- Radioterapia previa.

1. DETERMINACIÓN DE FACTORES DE PRONÓSTICO BIOLÓGICOS

Los factores de pronóstico y de predicción de respuesta que se estudiaron fueron los siguientes: tipo histológico, tamaño tumoral, estado axilar, grado histológico, receptores hormonales (RE y RP), factor de proliferación nuclear (Ki67) y HER2.

Algunas consideraciones a tener en cuenta en la valoración de dichos factores son las siguientes:

A. TIPOS HISTOLÓGICOS

Los tipos histológicos estudiados se agruparon de la siguiente manera:

1. CARCINOMAS INFILTRANTES

1.1. MEDULAR

1.2. COLOIDE

1.3. MICROPAPILAR

1.4. TUBULAR

1.5. LOBULILLAR

1.5.1. LOBULILLAR PLEOMÓRFICO

1.6. DUCTAL

1.6.1. DUCTALES INFILTRANTES NOS

1.6.2. TIPOS DE BAJA INCIDENCIA

1.6.2.1. CRIBIFORME

1.6.2.2. PAPILAR

1.6.2.3. DUCTAL-PAPILAR

2. CARCINOMAS IN SITU Y MICROINVASIVOS

2.1. CARCINOMA DUCTAL IN SITU (DCIS)

2.2. CARCINOMA MICROINFILTRANTE (MIC)

2.3. CARCINOMA LOBULILLAR IN SITU (LCIS)

2.4. CARCINOMA PAPILAR INTRAQUÍSTICO

3. LESIONES BENIGNAS CON SOSPECHA CITOLÓGICA DE "ATIPIAS"

B. VALORACIÓN GRADO HISTOLÓGICO

Para determinar el grado histológico de los tumores primarios, se utilizó el sistema de evaluación de Nottingham, modificación del sistema Bloom-Richardson, que tiene en cuenta el porcentaje de estructuras tubulares en el tumor, la variabilidad en la morfología nuclear y el número de mitosis. Las puntuaciones que se dan a cada uno de los criterios anteriores, se resumen en la tabla siguiente (Tabla 4).

Tabla 4: Criterios de evaluación del grado histológico tumoral (Sistema de evaluación de Nottingham).

FORMACIÓN TÚBULOS	PUNTUACIÓN
> 75%	1
10-75%	2
Menos de 10%	3
PLEOMORFISMO NUCLEAR	
Núcleos pequeños y uniformes	1
Variabilidad moderada en forma y tamaño nuclear	2
Núcleos grandes e irregulares	3
NÚMERO DE MITOSIS	
0-5	1
6-10	2
>11	3

El resultado de la suma de las puntuaciones determina el grado tumoral histológico, de esta forma se considera grado 1, si suma de 3 a 5 puntos, grado 2 si suma de 6 a 8 puntos y grado 3, más de 8.

C. VALORACIÓN RECEPTORES HORMONALES

El criterio para evaluar el resultado de la técnica inmunohistoquímica de la expresión de los receptor hormonales (RE y RP), fue el de valorar las áreas con máxima expresión y considerar como positiva la tinción en más del 10% de los núcleos tumorales.

D. VALORACIÓN KI67

El criterio para evaluar el resultado de la técnica inmunohistoquímica del Ki67, fue el de mirar en las áreas de mayor actividad proliferativa el porcentaje de núcleos que expresaban dicho factor. Hemos considerado como alta proliferación, la tinción en más del 25% de los núcleos tumorales.

E. VALORACIÓN HER2-neu

El estado del HER2 fue detectado mediante inmunohistoquímica e hibridación *in situ* (FISH o CISH) de acuerdo con el algoritmo de la institución (Falo et al., 2003).

La sobreexpresión fue determinada mediante IHQ con un anticuerpo monoclonal CB11 (Novocastra) y un anticuerpo policlonal (Dako). En el caso de IHQ con anticuerpo monoclonal, los casos se clasificaron como positivos si más del 10% de las células tumorales mostraban tinción completa de la membrana sin *background* citoplasmático. En el caso de IHQ mediante anticuerpo policlonal se evaluó la intensidad y el patrón de tinción de la membrana, con una puntuación entre 0 y 3+. Los valores 0 y 1+ corresponden a sobreexpresión negativa de HER2, el valor 2+ se considera positivo débil y el valor 3+ se considera sobreexpresión de HER2 (FISH/CISH, Oncor-Ventana/Zymed).

Los casos que no mostraban concordancia, entre los resultados IHQ de ambos tipos de anticuerpos se sometieron a hibridación *in situ*, para determinar el estado de amplificación del HER2. Se evaluaron 50 núcleos por muestra, y se consideró amplificación, cuando la media del número de señales por núcleo superaba 5. En los casos en que el número de copias es bajo se utilizó la hibridación *in situ* del centrómero del cromosoma 17, para descartar aneuploidias (Tabla 5).

Tabla 5: Criterios de evaluación del estado del HER2 mediante hibridación in situ.

Evaluación del estatus del gen HER2-neu por FISH/CISH.	
Amplificación	>10 copias del gen presentes por núcleo en >50% células tumorales.
Baja Amplificación	6-10 copias del gen presente por núcleo en >50% células tumorales.
Ausencia de Amplificación	1-5 copias del gen presentes por núcleo en >50% células tumorales.

La presencia de bajo número de copias del gen por núcleo se puede deber a polisomía del cromosoma. Utilizamos la corrección del número de copias del HER2 respecto al número de copias del centrómero en los casos de baja amplificación (Tabla 6).

Tabla 6: Corrección del número de copias del HER2 en el caso de baja amplificación.

	HER2	HER2/CENTRÓMERO 17
Amplificación	> 5	> 2
Ausencia de Amplificación	2-5	0.8-2

F. PERMEACIÓN VASCULAR

Para determinar la presencia de permeación vascular, se examinaron los vasos peritumorales en busca de células neoplásicas.

2. DEFINICIONES DEL TNM EN EL CÁNCER DE MAMA

Los tumores primarios se estadificaron en función de su tamaño -T- (Tabla 7) y del estado axilar -N-(Tabla 8) según la clasificación TNM (2003).

TUMOR PRIMARIO

Tabla 7: Estadificación anatomopatológica "pT" (TUMORAL).

pT	
pTX	TUMOR PRIMARIO QUE NO PUEDE SER EVALUADO
pT0	SIN EVIDENCIA DE TUMOR PRIMARIO
pTis	CARCINOMA IN SITU, CARCINOMA DUCTAL IN SITU, CARCINOMA LOBULILLAR IN SITU, O ENFERMEDAD DE PAGET DEL PEZÓN SIN TUMOR ASOCIADO.
pT1	TUMOR DE 2,0CM O MENOS EN LA MAYOR DIMENSIÓN
pT1mic	MICROINVASIÓN 0,1CM O MENOS EN LA MAYOR DIMENSIÓN
pT1a	TUMOR DE MÁS DE 0,1CM PERO NO MÁS DE 0,5CM EN LA MAYOR DIMENSIÓN
pT1b	TUMOR DE MÁS DE 0,5CM PERO NO MÁS DE 1,0CM EN LA MAYOR DIMENSIÓN
pT1c	TUMOR DE MÁS DE 1,0CM PERO NO MÁS DE 2,0CM EN LA MAYOR DIMENSIÓN
pT2	TUMOR DE MÁS DE 2,0CM PERO NO MÁS DE 5,0CM EN LA MAYOR DIMENSIÓN
pT3	TUMOR DE MÁS DE 5,0CM EN LA MAYOR DIMENSIÓN
pT4	TUMOR DE CUALQUIER MEDIDA CON EXTENSIÓN DIRECTA A: PARED TORÁCICA O PIEL.

Tabla 8: Estadificación anatomopatológica "pN" (GANGLIONAR).

pN	
pNX	GANGLIOS LINFÁTICOS REGIONALES QUE NO PUEDAN SER EVALUADOS
pN0	SIN METÁSTASIS EN LOS GANGLIOS LINFÁTICOS REGIONALES POR HISTOLOGÍA, SIN EXAMEN ADICIONAL POR CÉLULAS TUMORALES AISLADAS
pN0(i-)	SIN METÁSTASIS EN LOS GANGLIOS LINFÁTICOS REGIONALES POR HISTOLOGÍA, INMUNOHISTOQUÍMICA NEGATIVA
pN0(i+)	POSITIVOS MEDIANTE TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS O CÉLULAS TUMORALES AISLADAS O <i>CLUSTERS</i> QUE NO SUPERAN LOS 0,2 MM
pN0(mol-)	SIN METÁSTASIS EN LOS GANGLIOS LINFÁTICOS REGIONALES POR HISTOLOGÍA, HALLAZGOS MOLECULARES NEGATIVOS (RT-PCR)
pN0(mol+)	SIN METÁSTASIS EN LOS GANGLIOS LINFÁTICOS REGIONALES POR HISTOLOGÍA, HALLAZGOS MOLECULARES POSITIVOS (RT-PCR)
pN1mi	MICROMETÁSTASIS DE TAMAÑO COMPRENDIDO ENTRE 0,2 Y 2 MM
pN1a	METÁSTASIS EN 1-3 GANGLIOS AXILARES, ALGUNA DE ELLAS DE TAMAÑO MAYOR A LOS 2 MM
pN1b	MICROMETÁSTASIS EN GANGLIO DE MAMARIA INTERNA
pN1c	METÁSTASIS EN 1-3 GANGLIOS AXILARES Y MICROMETÁSTASIS EN GANGLIO DE MAMARIA INTERNA
pN2a	METÁSTASIS EN 4-9 GANGLIOS AXILARES ALGUNA DE ELLAS DE TAMAÑO MAYOR A LOS 2 MM
pN2b	METÁSTASIS EN GANGLIO(S) DE MAMARIA INTERNA DETECTADA CLÍNICAMENTE EN AUSENCIA DE GANGLIOS AXILARES AFECTADOS
pN3a	METÁSTASIS EN 10 O MÁS GANGLIOS AXILARES (ALGUNA DE ELLAS DE TAMAÑO MAYOR A LOS 2 MM) O METÁSTASIS EN GANGLIOS INFRACLAVICULARES
pN3b	METÁSTASIS EN GANGLIO(S) DE MAMARIA INTERNA DETECTADA CLÍNICAMENTE EN PRESENCIA DE GANGLIO(S) AXILARES AFECTADOS, O METÁSTASIS EN MÁS DE 3 GANGLIOS AXILARES Y MICROMETÁSTASIS EN GANGLIOS DE MAMARIA INTERNA DETECTADOS POR GC, PERO NO CLÍNICAMENTE
pN3c	METÁSTASIS EN GANGLIO(S) SUPRACLAVICULAR(ES)

3. CLASIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS TUMORES.

Los tumores se agruparon para su estudio en función de la expresión de RE, RP y HER2, clasificamos los tumores infiltrantes como tipo luminal (RE+, RP+, HER2-), triple negativo (RE-, RP-, y HER2-) y HER2 positivo (HER2+).

4. CLASIFICACIÓN DE St. GALLEN EN GRUPOS DE RIESGO.

Los tumores se agruparon para su estudio según la clasificación de St. Gallen en grupos de riesgo de recidiva, de la siguiente manera: tumores de bajo riesgo (tumores de tamaño inferior o igual a 10 mm, de grado 1 o 2, y con RE+ y/o RP+), tumores de riesgo medio (tumores de entre 10-20 mm, de grado 1 o 2, y con RE+ y/o RP+) y tumores de riesgo alto (tumores de más de 20 mm, o de grado 3, o con ambos receptores hormonales negativos) (Tabla 9).

Tabla 9: Criterios utilizados en la clasificación en grupos de riesgo según St. Gallen.

	RIESGO BAJO	RIESGO MEDIO	RIESGO ALTO
TAMAÑO	≤ 10 mm y	10-20 mm y	> 20 mm o
GRADO	I o II y	I o II y	III o
RECEPTORES	+ (RE y/o RP)	+ (RE y/o RP)	- (RE y RP)

5. TOMA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.

Se recogieron las muestras de tumor y ganglios centinelas durante la cirugía, en los quirofanos del HUB. Cada ganglio centinela fue seccionado en dos mitades, una de las mitades se destinó al estudio histológico siendo fijado en formol al 10%. La otra mitad se congeló en nitrógeno líquido para proceder posteriormente a la extracción de RNA.

El marcador utilizado para la detección de micrometástasis fue la citoqueratina 19 (KRT19), por inmunohistoquímica fue el Cam 5.2.

Para el análisis histológico del ganglio se evaluaron 5 secciones de 4 μ m de grosor, a diferentes niveles del ganglio, que fueron estudiadas mediante tinción alterna de hematoxilina-

eosina e inmunohistoquímica (Cam 5.2), de esta forma se estudio mediante H&E, el nivel 1 y 3, y mediante IHQ, el nivel 2 y 4.

Para la extracción del RNA se trituró el ganglio en solución D utilizando un homogenizador Ultra-Turrax T25 (IKA-Labortechnik, Staufen, Alemania). El protocolo utilizado es el método rápido descrito por Gauthier et al. Se realizaron medidas al espectrofotómetro a 260 y 280 nm.

6. TÉCNICA RT-PCR

6.1. PREPARACIÓN DEL cDNA.

4 µg de RNA total fueron retrotranscritos a cDNA en un volumen final de 20 µl. El RNA total junto con 1 µl de oligo dT12-18 (500 µg/ml) (Pharmacia Biotec) y 1 µl de dNTPs 10 mM se sometió a 5 min. de desnaturalización a 65°C y se colocó inmediatamente en hielo. Se añadió 40 U RNAgurad™ (Pharmacia Biotec), 4 µl de 5X First-Strand Buffer y 2µl de 0.1µl de DTT (Gibco-BRL), la reacción se incubó durante 2 min. a 37°C. Se añadió 200 U de transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina Moloney (MMLV, Gibco-BRL) y se incubó durante 50 min. a 37°C, inactivando la reacción al calentar a 70°C durante 15 min. Se incluyeron un control positivo para la expresión de KRT19 y un control negativo sin RNA.

6.2. RT-PCR ESTÁNDAR.

Para la amplificación se utilizaron 2 µl de cDNA en un volumen final de 25 µl que contenía dNTPs a 0.05 mM, 25 pmol de ambos primers (sense y antisense), CL₂Mg a 2.5 mM y 1 U de Taq polimerasa (Gibco-BRL).

Las secuencias de los primers y el tamaño del fragmento amplificado se muestran en la Tabla. Se utilizó la β-actina como control interno de la reacción. También se incluyó un control negativo sin cDNA. Los primers de la KRT19 amplifican una región que contiene un intrón en la secuencia genómica y están diseñados para evitar la amplificación de los pseudogenes descritos (Tabla 10) (Schoenfeld et al., 1996). La reacción se llevo a cabo utilizando los termocicladores (PTC-100, MJ Research, USA) con el siguiente programa: 5 min. a 92°C, seguido de 35 ciclos de 30 seg. a 92°C, 60°C y 72°C con un ciclo final de extensión de 5 min. a 72°C.

El producto amplificado fue sometido a separación electroforética en gel de acrilamida al 9% y teñido con bromuro de etidio. Se tomaron fotografías con una cámara Kodak DC-120.

Tabla 10: Primers utilizados en la RT-PCR.

GEN	SECUENCIA 5'-3'	TAMAÑO
KRT19	5'-AGGTGGATTCCGCTCCGGGCA-3'	460 pb
	5'-ATCTTCCTGTCCCTCGAGCA-3'	
β-ACTINA	5'-CACTGTGTTGGCGTACAGGT-3'	154 pb
	5'-TCATCACCATTGGCAATGAG-3'	

7. RT-PCR REAL-TIME

LIGHTCYCLER (ROCHE)

Se utilizó 1 μ l de cDNA para su amplificación mediante el termociclador LightCycler (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), utilizando SYBR GREEN fast start kit (Roche, Germany) siguiendo las especificaciones del fabricante. Los primers utilizados fueron los anteriormente descritos por Schröder, están localizados en 2 exones diferentes y evitan la amplificación de los pseudogenes descritos para la KRT19 (Schroder et al., 2003). Para normalizar los niveles de expresión se utilizó la β 2-microglobulina (B2M) como control interno. Cada reacción contiene Cl_2Mg a 2mM y 0.3 pmol de ambos primers en un volumen final de 20 μ l.

Las secuencias de los primers y el tamaño del fragmento amplificado se muestran en la tabla 11. El programa utilizado fue el siguiente: 10 min. de desnaturalización, durante la amplificación 40 ciclos de 95°C, 56°C y 72°C durante 3, 15 y 20 seg. con una lectura sencilla de fluorescencia a 72°C en el caso de la B2M y de 84°C para la KRT19 para evitar lecturas erróneas debido a la formación de *primers dimers*. Finalmente se someten las muestras a un programa de *melting*: 95°C durante 15 seg.; 65°C durante 30 seg. y hasta 98°C a una velocidad de 0.1°C/seg con registro continuo de la fluorescencia.

Se registran los *crossing points* (CP) de las muestras utilizando el método del máximo de la segunda derivada, a través del *software* 4.0 del LightCycler (Roche Diagnostics). Dicho método calcula automáticamente el punto a partir del cual el aumento en la fluorescencia es más rápido y se corresponde con el ciclo a partir del cual se distingue entre la fluorescencia debido a la amplificación de la muestra y la debida al *background*. También se registran las curvas de *melting*, la determinación de la temperatura de *melting* del fragmento amplificado sirve para caracterizar el producto amplificado. El tamaño de las bandas es comprobado en un gel de agarosa al 1.5%.

Tabla 11: Primers utilizados en la RT-PCR *Real-Time*.

GEN	SECUENCIA 5'-3'	TAMAÑO	T_m
KRT19	5'-ACTACAGCCACTACTACACGAC-3' 5'-CAGAGCCTGTTCCGTCTCAAAC -3'	148 pb	87 °C
B2M	5'-CCAGCAGAATGGAAAGTC-3' 5'-GATGCTGCTTACATGTCTCG -3'	268 pb	84 °C

ABI-PRISM (APPLIED BIOSYSTEMS)

Se utilizó 1 µl de cDNA para su amplificación mediante el termociclador Applied Biosystems 7500 (Applied Biosystems, Foster City, U.S.A), utilizando TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) siguiendo las especificaciones del fabricante. Los primers y la sonda utilizados para la amplificación de la KRT19, fueron los anteriormente descritos por Inokuchi, están localizados en 2 exones diferentes y evitan la amplificación de los pseudogenes descritos para la KRT19 (Inokuchi et al., 2003).

Para normalizar los niveles de expresión se utilizó la β2-microglobulina (B2M) como control interno, se utilizó el ensayo inventariado Hs99999907_m1 (Applied Biosystems), formado por dos *primers* no marcados (concentración final de 900 nM) y una sonda marcada tipo MGB (concentración final de 250 nM). Cada reacción se realizó en un volumen final de 20 µl.

Las secuencias de los primers y el tamaño del fragmento amplificado se muestran en la tabla 12. El programa utilizado fue el siguiente: 10 min de desnaturalización, durante la amplificación 40 ciclos de 95°C y 60°C durante 15 y 60 seg. La sonda hibrida específicamente con una secuencia localizada entre ambos primers, durante el curso de la PCR la actividad nucleasa de la Taq polimerasa, hidroliza la señal fluorescente de la sonda, que al ser separado del *quencher* emite fluorescencia, que es registrado en cada ciclo. Se establecieron los

umbrales de fluorescencia. El sistema Applied, utiliza como referencia pasiva para normalizar las variaciones propias de las oscilaciones en la señal de fluorescencia, el fluorocromo ROX.

Se registraron los *cycle thresholds* (Ct) o ciclo de la PCR en el cual la fluorescencia supera la fluorescencia de fondo. Se establecieron los umbrales basales de fluorescencia en 0,235259 para la B2M y en 0,073520 para la KRT19.

Tabla 12 : Primers y sonda utilizados en la RT-PCR Real-Time plataforma Applied.

GEN	SECUENCIA 5'-3'	TAMAÑO
KRT19	5'-GAAGAACCATGAGGAGGAAATCA-3'	129 pb
	5'-ACCTCATATTGGCTTCGCATGT -3'	
SONDA	(FAM)-CGGGCACCGATCTCGCCAAG-(TAMRA)	
B2M	Hs99999907_m1 (Applied Biosystems)	75 pb

Eficiencia de la amplificación por PCR Real-time. A partir de una muestra de ganglio metastásico, se realizó la retrotranscripción a cDNA a partir de 3 µg de RNA total, en un volumen total de 20 µl. Se hicieron una serie de cinco diluciones, y se utilizó 1µl cDNA (150, 50, 16, 5 y 2 ng de RNA total retrotranscrito) para la amplificación mediante LightCycler o Applied. Se realizó el experimento por triplicado y se registraron los CP o Ct de las muestras.

A partir de las medias de los CP o Ct para cada concentración se calculó la eficiencia (E) de amplificación mediante la fórmula $E=10^{(-1/\text{pendiente})}$.

Para determinar la cuantificación relativa de la KRT19 respecto al gen de referencia B2M, se utilizaron las fórmulas de las rectas patrón generadas por las diluciones anteriores y sustituyendo los valores por el valor de CP/Ct (Figura 12).

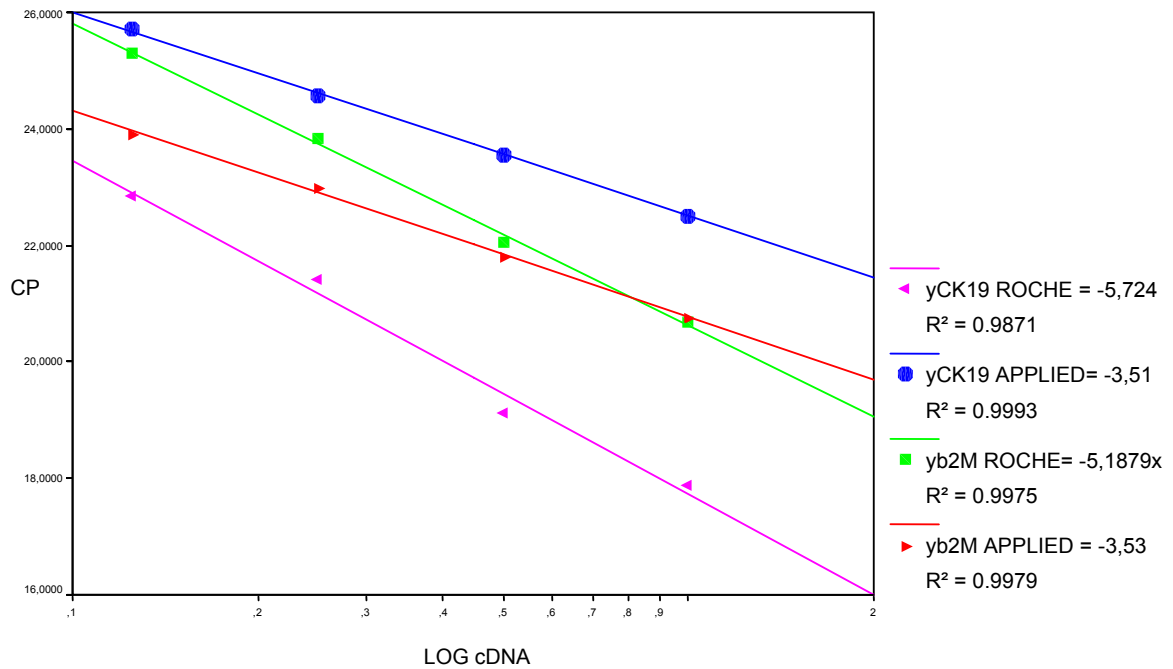


Figura 12: Eficiencias de amplificación del gen de referencia B2M y de la KRT19. Representación gráfica de los CP frente al logaritmo de la concentración de Cdna

7.1. DETERMINACIÓN DE LOS VALORES RELATIVOS

A partir de los valores de CP o Ct generados para cada muestra, por las diferentes plataformas, se calculó el logaritmo de la cantidad inicial de partida mediante la siguiente fórmula:

$$y = ([Ct \text{ o } CP] - b) / m$$

b = y-intersección de la recta patrón

m = pendiente de la recta patrón (Eficiencia)

Por lo tanto la cantidad inicial es la inversa del logaritmo ($10^{[y]}$). Las unidades son las mismas que las utilizadas para construir la recta patrón.

Los valores normalizados son el resultado del cociente: KRT19/B2M.

7.2. ANÁLISIS DE DATOS CUANTITATIVOS MEDIANTE LinRegPCR

Se utilizó el programa LinRegPCR para analizar los datos bajo el supuesto de que existe variabilidad individual en la eficiencia de amplificación. El programa calcula mediante regresión lineal las concentraciones iniciales de RNAm de cada muestra a partir de los registros de fluorescencia de cada muestra en cada ciclo.

LIGHTCYCLER (ROCHE)

Se generó un archivo Excel, con todos los registros de fluorescencia de las muestras del experimento generados por el programa Lightcycler (4.0). Con el archivo Excel abierto, se importan los datos al programa LinRegPCR, realizando la lectura del archivo desde la columna B hasta el fin de columnas del experimento (depende del número de muestras) y desde la fila 2 hasta el fin de las filas del experimento (depende del número de ciclos).

Se realiza la regresión lineal (opción *fit all*) con el fin de observar el intervalo de linealidad para cada muestra, y comprobar que corresponden a la eficiencia real y que no se producen desviaciones del ajuste debidas a interpretaciones erróneas de la pendiente. Una vez inspeccionados los datos, se exportan a una hoja de Excel, los resultados se expresan en unidades arbitrarias de fluorescencia (Figura 13). Los valores normalizados se producen al dividir la cantidad inicial de KRT19 entre los valores respectivos de B2M.

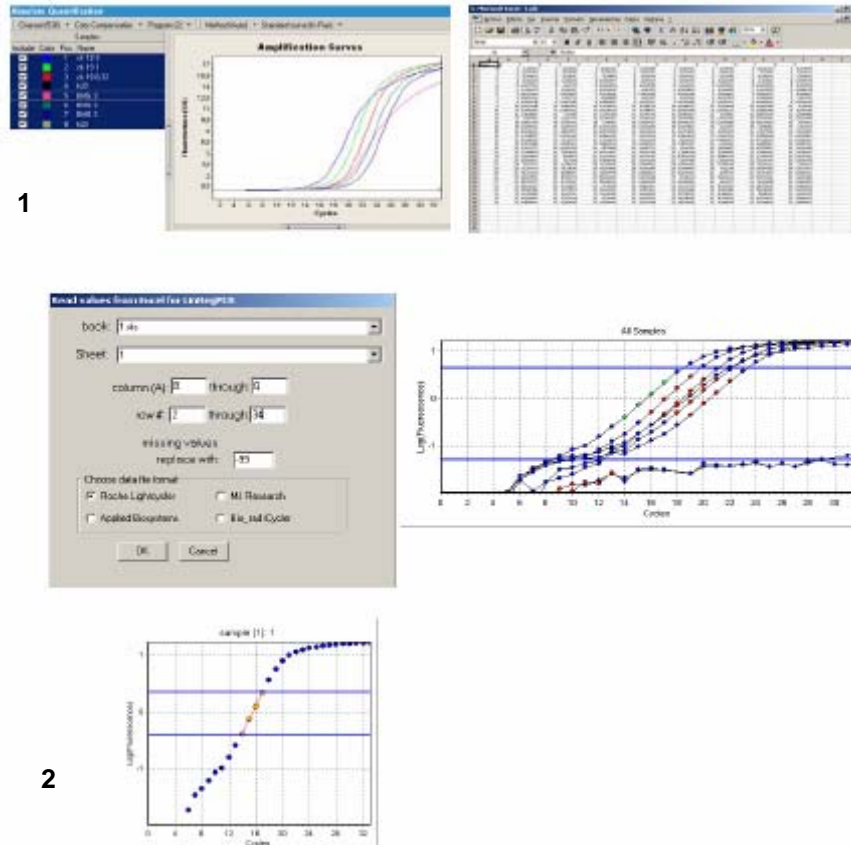


Figura 13: Análisis de datos generados por la plataforma *Lightcycler* mediante el programa *LinReg PCR*.

- EXPORTACIÓN DE LECTURAS DE FLUORESCENCIA A FORMATO EXCEL
1. IMPORTACIÓN DE DATOS POR EL PROGRAMA *LINREG*
 2. ANÁLISIS GLOBAL E INDIVIDUAL DE TODAS LAS MUESTRAS

ABI-PRISM (APPLIED BIOSYSTEMS)

Para exportar los datos a partir del programa ABI PRISM® Sequence Detection System software, una vez realizado el análisis estándar se exportan las medidas del registro de fluorescencia como archivos CSV, estos archivos se pueden abrir utilizando el programa Excel. Con el archivo Excel abierto, se importan los datos al programa LinRegPCR, realizando la lectura del archivo desde la columna B hasta el fin de columnas del experimento (depende del número de ciclos) y desde la fila 1 hasta el fin de las filas del experimento (depende del número de muestras). Se procede a trabajar con el programa LinRegPCR, tal como hemos indicado en el apartado anterior.

8. TÉCNICA INMUNOHISTOQUÍMICA

La técnica inmunohistoquímica se empleó para determinar la expresión del HER2 (anticuerpo CB11 y policlonal), receptores hormonales (estrógeno y progesterona) e índice proliferativo (Ki67).

Se cortaron secciones de 3 μm y se montaron sobre portaobjetos ChemMate™ Capillary Gap Microscope Slides (DakoCytomation, Denmark). Se desparafinaron las muestras a través de una batería de xiloles y etanoles. Una vez desparafinadas las muestras se sometieron a pretratamiento en olla a presión con citrato pH=6, durante 3 minutos a presión máxima (excepción CB11, no requiere pretratamiento y Cam 5.2 que requiere digestión con pepsina 10 min. a temperatura ambiente).

En la siguiente tabla (Tabla 13) se recogen los datos sobre los anticuerpos utilizados, el tipo, el clon, la casa comercial y la dilución utilizada.

Tabla 13: Características de los anticuerpos utilizados en la IHQ.

	ANTICUERPO	CLON	MARCA	DILUCIÓN
QUERATINAS 7 y 8	MONOCLONAL	CAM 5.2	BD (Becton Dickinson)	PREDILUIDO
HER2	MONOCLONAL	CB11	Novocastra™	1:30
HER2	POLICLONAL		DAKO	1:350
RE α	MONOCLONAL	1D5	DAKO	1:30
RP	MONOCLONAL	PgR 636	DAKO	PREDILUIDO
Ki67	MONOCLONAL	MM1	Novocastra™	1:50

Después de lavado con agua destilada las muestras se introdujeron en un inmunoteñidor automático, TechMate™ (DakoCytomation), se utilizó el kit ChemMate™

Detection Kit, basado en el método de estreptavidina conjugada (LSAB) y se utilizó un procedimiento en tres etapas: incubación de la muestra con el anticuerpo diluido según la concentración indicada en la tabla anterior, durante 40 min., incubación con el anticuerpo secundario marcado con biotina 25 min e incubación con estreptavidina peroxidasa durante 25 min. Todas las muestras fueron sometidas a bloqueo de la peroxidasa durante 7,30 min.

La reacción se visualiza tras reacción con DAB (7,30 min.) y contraste con hematoxilina (1 min.).

9. TÉCNICA HIBRIDACIÓN IN SITU: FISH Y CISH

La técnica de hibridación in situ se empleó para determinar si el oncogén HER2 se encontraba amplificado en los casos en que el resultado de la inmunohistoquímica no era concordante entre los dos anticuerpos utilizados.

Se cortaron secciones de 3 μm y se montaron sobre portaobjetos ChemMate™ (DakoCytomation), se dejaron las muestras *overnight* a 65°C. Se realizó la desparafinación a través de una batería de xiloles y etanoles, dejando las muestras secar 10 min. a temperatura ambiente.

FISH

Se realizó pretratamiento de la muestras mediante *Oncor Pretreatment Solution*, durante 15 min. a 43°C, después de enfriar las muestras se continuó con el pretratamiento con una digestión con *Oncor Protein Digesting Enzyme Working Solution* 75 min. a 37°C. Las muestras se deshidrataron mediante etanol y se dejaron secar al aire antes de poner la sonda. Se realizó la desnaturalización de la sonda (Oncor-Ventana) sobre la muestra durante 10 min. a 72°C. Después se dejaron hibridando *overnight* en una cámara húmeda a 37°C. Se realizó el lavado de astringencia para eliminar la sonda no hibridada en SSC 2X, 10 min. 37°C. Se inactivó la peroxidasa con H₂O₂ (3%).

Se incubó la muestra con *Oncor Fluorescein-Labeled Avidin Detection* durante 20 min. a temperatura ambiente. Después se incubaron las muestras con *Oncor Anti-Avidin Antibody*

Se incubó la muestra con un anticuerpo *mouse* antidigoxigenina 1h. a temperatura ambiente. Después se incubaron las muestras con 100µl HRP-Goat Anti-mouse 40 min. a temperatura ambiente. Los núcleos se contrastaron con DAPI.

CISH

Se realizó pretratamiento de la muestras mediante citrato a pH=6, durante 5 min. a presión máxima, después de enfriar las muestras se continuó con el pretratamiento con una digestión con pepsina durante 8 min. a 37°C. Las muestras se deshidrataron mediante etanol y se dejaron secar al aire antes de poner la sonda. Se realizó la desnaturalización de la sonda (Zymed) sobre la muestra durante 7 min. a 95°C. Después se dejaron hibridando *overnight* en una cámara húmeda a temperatura ambiente. Se realizó el lavado de astringencia para eliminar la sonda no hibridada en SSC 0.5 X, 5 min. 75°C. Se inactivó la peroxidasa con H₂O₂ (3%). Se incubó la muestra con un anticuerpo *mouse* antidigoxigenina 1h. en el caso del HER2 y con HRP- estreptavidina en el caso de la sonda centrómerica, a temperatura ambiente. En el caso del HER2 se incubaron las muestras con 100µl HRP-Goat Anti-mouse (HRP/fab *polimer*) 1h. a temperatura ambiente.

Se realizó el revelado con DAB, 30 min., y se contrastó con hematoxilina, 2 min.

10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó mediante el paquete estadístico SPSS 11.0 y 13.0 (SPSS Inc.).

El estudio de asociación entre variables cualitativas, se llevo a cabo mediante contrastes de independencia Ji-cuadrado. Mediante la prueba de Ji-cuadrado de Pearson se contrastó si las diferencias observadas entre los grupos son debidas al azar, considerando significativos resultados con $p < 0.05$. En las ocasiones en que el 20% de las celdas de la tabla de contingencia muestran una frecuencia esperada menor a 5 se utilizó la prueba exacta de Fisher

Para contrastar la influencia de varias variables sobre una variable respuesta dicotómica (Análisis multivariado) utilizamos la regresión logística. Se consideraron los coeficientes asociados a cada variable que mostraban significación $p < 0.05$. Se evaluó la bondad del ajuste del modelo establecido mediante la prueba de Hosmer-Lemeshow, se consideró que la bondad de ajuste global es buena cuando la significación se aproxima a 1.

Para caracterizar los resultados de las pruebas diagnóstica producidos por las variables continuas, se utilizó las curvas ROC (Receiver Operating Characteristic), son curvas en las que se presenta la sensibilidad en función de los falsos positivos (complementario de la especificidad) para distintos puntos de corte. Se estudio el rendimiento global de las pruebas analizando el área bajo la curva, y se utilizaron para comparar varias pruebas.

Para contrastar muestras independientes que siguen una distribución no paramétrica utilizamos el test Mann-Whitney, sólo se consideraron significativos $p < 0.05$.

HIPÓTESIS

La utilización de la técnica de la RT-PCR es un método más sensible y costo-eficaz en la detección de células circulares y micrometástasis que el examen rutinario histopatológico del GC en pacientes con cáncer de mama.

OBJETIVOS

IV. OBJETIVOS.

1. Analizar el valor de la RT-PCR en la detección de metástasis ocultas en ganglios centinela de cáncer de mama, compararla con la técnica anatomopatológica standard (cortes seriados e IHQ).

2. Comparar los resultados de expresión relativa con la técnica anatomopatológica, utilizando:

2.1. Diferentes métodos de normalización. (Recta patrón y eficiencia individual de la muestra)

2.2. Diferentes plataformas Real-Time (Roche y Applied).

3. Comparar los resultados de las técnicas histopatológicas y moleculares con las características de los tumores infiltrantes relacionadas con el pronóstico.

4. Analizar si la detección de micrometástasis en los ganglios centinelas (detectada mediante técnicas diferentes) está determinada por algunas de las características del tumor primario (Análisis multivariado).

5. Evaluar la costo-eficacia de las diferentes técnicas en el diagnóstico de micrometástasis en ganglios centinela.

RESULTADOS

V. RESULTADOS

1. DESCRIPTIVOS DE LA SERIE TUMORAL.

La mayor parte de las neoplasias de la serie son carcinomas infiltrantes, con 636 carcinomas ductales (80 %), y 29 carcinomas lobulillares (3.6%). Otras variantes infiltrantes, menos frecuentes incluidas en el estudio, fueron los carcinomas coloides, 17 casos (2,1%), los carcinomas medulares, 4 casos (0,5%), los carcinomas micropapilares, 3 casos (0,4%) y los carcinomas tubulares, 6 casos (0,8%).

El resto de tumores que forman parte de la serie son carcinomas in situ y microinvasivos, 87 casos (10,9%).

Un grupo de lesiones benignas con sospecha citológica de "atipias" sobre las que se realizó la técnica del ganglio centinela en previsión de malignidad en el diagnóstico definitivo, incluyen 13 casos (1,6%).

Dicha información queda recogida el siguiente gráfico.

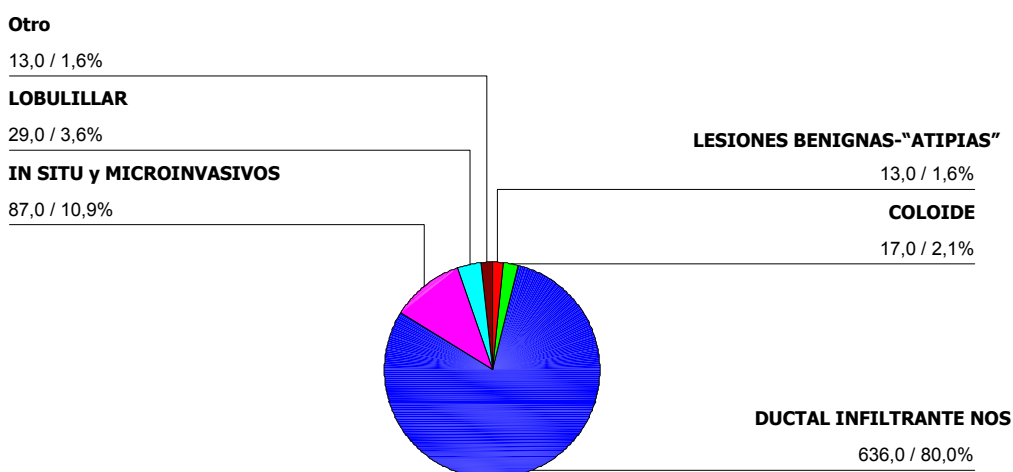


Gráfico 1: Principales tipos histológicos de la serie tumoral.

A. CARCINOMA INFILTRANTE.

Estudiamos por separado en esta serie los carcinomas infiltrantes tipo medular, coloide, micropapilar, tubular, lobulillar y ductal (que comprenden los ductales infiltrantes NOS y otros tipos de muy baja incidencia en esta serie, lo que no permite analizarlos separadamente, como: el cribiforme, papilar y el ductal-papilar). Los carcinomas ductales suponen el tipo de carcinoma infiltrante más frecuente en nuestra serie con 636 casos, lo que corresponde al 91,5% de los carcinomas infiltrantes (Tabla 14).

Tabla 14: Frecuencia y porcentaje de los tipos de carcinomas infiltrantes estudiados.

TIPOS DE CARCINOMAS INFILTRANTES				
	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
COLOIDE	17	2,4	2,4	2,4
DUCTAL INFILTRANTE *	636	91,5	91,5	94,0
LOBULLAR **	29	4,2	4,2	98,1
MEDULAR	4	,6	,6	98,7
MICROPAPILAR	3	,4	,4	99,1
TUBULAR	6	,9	,9	100,0
Total	695	100,0	100,0	

* Incluye carcinoma cribiforme infiltrante, carcinoma papilar y carcinoma ductal-papilar.

** 5 casos (17,2 %) de carcinoma lobulillar infiltrante, corresponden a la variante pleomórfica.

1. ESTADIFICACIÓN TNM.

1.1. ESTADIFICACIÓN "pT" (TUMORAL).

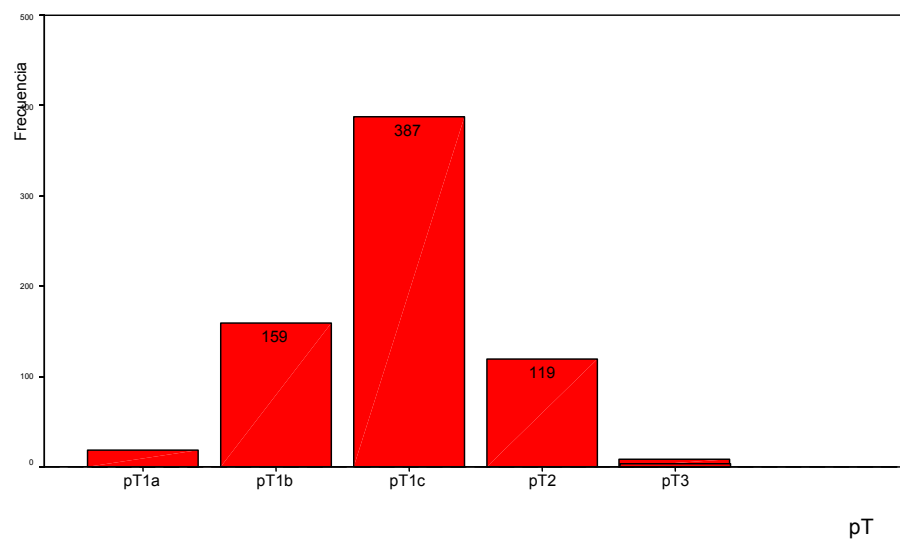
El 2,6% de los carcinomas infiltrantes estudiados corresponden a tumores de tamaño entre 1 y 5 mm (pT1a), el 22,9% a carcinomas de entre 5 y 10 mm (pT1b), el 55,7% son tumores de entre 10 mm y 20 mm (pT1c). Los tumores de entre 20 mm y 50 mm (pT2) representan el 17,1 % de esta serie. Los tumores de tamaño mayor de 50 mm (pT3), corresponden al 1,8 % (Tabla 15).

pT - CARCINOMA INFILTRANTE

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
pT1a	18	2,6	2,6	2,6
pT1b	159	22,9	22,9	25,5
pT1c	387	55,7	55,7	81,2
pT2	119	17,1	17,1	98,3
pT3	12	1,8	1,8	100,0
Total	695	100	100	100,0

Tabla 15: Frecuencia y porcentaje de los tamaños tumorales en función de la estadificación pT, en la serie de carcinoma infiltrante.

Gráfico 2: Histograma de frecuencias de los tamaños tumorales en función de la clasificación pT.



1.2. ESTADIFICACIÓN "pN" (GANGLIONAR).

En esta serie, el 61,2% de los casos son pN0(sn) - no se detectó enfermedad en la evaluación histológica ni molecular -. El 19,9 % de los casos son pN0(mol+)(sn) - positivos sólo mediante técnicas moleculares -. El 5,6% de los casos son pN0(i+)(sn) - positivos mediante técnicas inmunohistoquímicas o células tumorales aisladas o *clusters* que no superan los 0,2 mm. El 5,2% de los casos son pN1mi(sn) - micrometástasis de tamaño comprendido entre 0,2 y 2 mm -. El 8,2 % de los casos son pN1a(sn) - metástasis de tamaño mayor a los 2 mm – (Tabla 16 y Gráfico 3).

Tabla 16: Frecuencias y porcentajes del estado axilar en función de la estadificación pN, en la serie de carcinoma infiltrante.

pN - CARCINOMA INFILTRANTE

	<i>Frecuencia</i>	<i>Porcentaje</i>	<i>Porcentaje válido</i>	<i>Porcentaje acumulado</i>
<i>pN0</i>	425	61,2	61,2	61,2
<i>pN0(mol+)</i>	138	19,9	19,9	81,0
<i>pN0(i+)</i>	39	5,6	5,6	86,6
<i>pN1mi</i>	36	5,2	5,2	91,8
<i>pN1a</i>	57	8,2	8,2	100,0
<i>Total</i>	695	100,0	100,0	

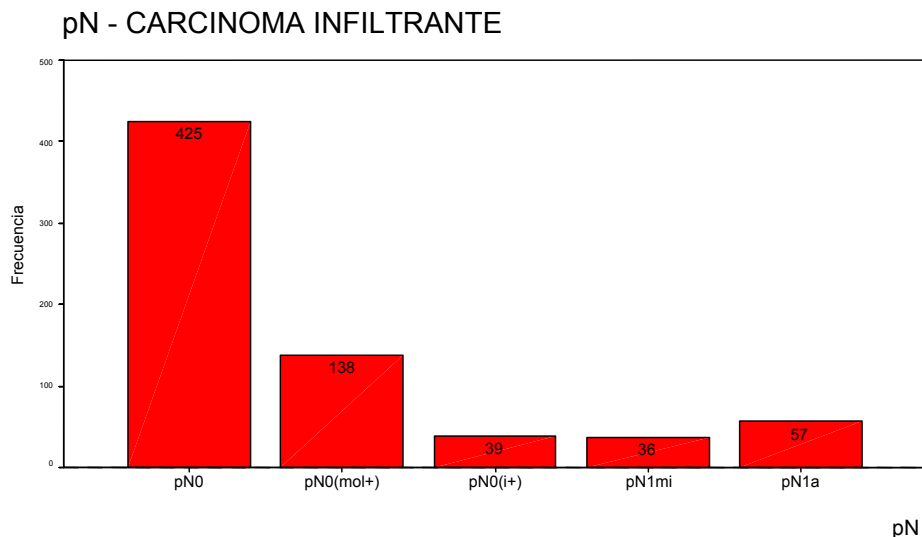


Gráfico 3 Histograma de frecuencias del estado axilar en función de la clasificación pN.

2. PERMEACIÓN VASCULAR.

Se dispone información sobre la permeación vascular en 683 tumores, en 54 casos (7,9%) se detectó permeación vascular en el estudio histológico (Tabla 17).

Tabla 17: Frecuencias y porcentajes de la presencia de permeación vascular en el tumor primario, en la serie de carcinoma infiltrante.

PERMEACIÓN VASCULAR - CARCINOMA INFILTRANTE

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulado
NEGATIVO	629	92,1	92,1
POSITIVO	54	7,9	100,0
Total	683	100,0	

3. TUMORES MULTICÉTRICOS Y CONTRALATERALES.

El 93,5% de los tumores, eran únicos, mientras que en el restante 6,5% se detectó más de un foco tumoral (Tabla 18).

Tabla 18: Frecuencias y porcentajes de la presencia de tumores multicéntricos, en la serie de carcinoma infiltrante.

TUMORES MULTICÉTRICOS -CARCINOMA INFILTRANTE

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
NEGATIVO	650	93,5	93,5	93,5
POSITIVO	45	6,5	6,5	100,0
Total	695	100,0	100,0	

El 1,6% de los casos presentaban en el momento del diagnóstico, otro foco tumoral en la mama contralateral (Tabla 19).

Tabla 19: Frecuencias y porcentajes de la presencia de tumores contralaterales, en la serie de carcinoma infiltrante.

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
NEGATIVO	684	98,4	98,4	98,4
POSITIVO	11	1,6	1,6	100,0
Total	695	100,0	100,0	

4. GRADO TUMORAL.

Se dispone de información sobre el grado tumoral en 665 tumores. El 8,7 % de los tumores son grado 1, el 59,4% grado 2, y el 31,9% grado 3 (Tabla 20).

Tabla 20: Frecuencias y porcentajes del grado histológico tumoral, en la serie de carcinoma infiltrante.

GRADO - CARCINOMA INFILTRANTE				
	<i>Frecuencia</i>	<i>Porcentaje</i>	<i>Porcentaje válido</i>	<i>Porcentaje acumulado</i>
1	58	8,7	8,7	8,7
2	395	59,4	59,4	68,1
3	212	31,9	31,9	100,0
<i>Total</i>	665	100,0	100,0	

5. RECEPTORES HORMONALES E ÍNDICE PROLIFERATIVO.

En 668 tumores infiltrantes, la expresión inmunohistoquímica del receptor de estrógenos (RE) es positiva (tinción positiva en más del 10% de los núcleos tumorales) en el 88,5% de los casos (Tabla 21).

Tabla 21: Frecuencias y porcentajes de la expresión IHQ del RE en el tumor primario, en la serie de carcinoma infiltrante.

RE - CARCINOMA INFILTRANTE			
	<i>Frecuencia</i>	<i>Porcentaje</i>	<i>Porcentaje acumulado</i>
<i>NEGATIVO</i>	77	11,5	11,5
<i>POSITIVO</i>	591	88,5	100,0
<i>Total</i>	668	100,0	

En 663 tumores infiltrantes, la expresión inmunohistoquímica del receptor de progesterona (RP) es positiva (tinción positiva en más del 10% de los núcleos tumorales) en el 74,8% de los casos (Tabla 22).

Tabla 22: Frecuencias y porcentajes de la expresión IHQ del RP en el tumor primario, en la serie de carcinoma infiltrante.

RP CARCINOMA INFILTRANTE

	<i>Frecuencia</i>	<i>Porcentaje</i>	<i>Porcentaje acumulado</i>
NEGATIVO	167	25,2	25,2
POSITIVO	496	74,8	100,0
Total	663	100,0	

En 578 tumores infiltrantes, la expresión inmunohistoquímica de la proteína nuclear Ki67 indica alta actividad proliferativa (tinción positiva en más del 25% de los núcleos tumorales) en el 13% de los casos (Tabla 23).

Tabla 23: Frecuencias y porcentajes de la expresión IHQ de Ki67 en el tumor primario, en la serie de carcinoma infiltrante.

KI67 - CARCINOMA INFILTRANTE

	<i>Frecuencia</i>	<i>Porcentaje</i>	<i>Porcentaje acumulado</i>
NEGATIVO	503	87,0	87,0
POSITIVO	75	13,0	100,0
Total	578	100,0	

6. HER2-neu.

En 522 tumores infiltrantes, la determinación de sobreexpresión o amplificación de HER2-neu, de acuerdo con el algoritmo de la Institución resulta positiva en el 9,2% de los casos (Tabla 24).

HER2-neu

	<i>Frecuencia</i>	<i>Porcentaje</i>	<i>Porcentaje acumulado</i>
NEGATIVO	474	90,8	90,8
POSITIVO	48	9,2	100,0
Total	522	100,0	

Tabla 24: Frecuencias y porcentajes del estado del HER2 En el tumor primario, en la serie de carcinoma infiltrante.

7. CLASIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS TUMORES.

En función de la expresión de RE, RP y HER2, clasificamos los tumores infiltrantes como tipo luminal (RE+, RP+, HER2-), triple negativo (RE-, RP-, y HER2-) y HER2 positivo (HER2+).

Se dispone de esta información de 519 tumores infiltrantes. El 83% corresponden a tumores de tipo luminal, el 7,7 % a tumores triple negativos, y el 9,2 % restante a HER2 positivo (Tabla 25).

Tabla 25: Frecuencias y porcentajes de los tipos tumorales luminal, triple negativo y HER2, en la serie de carcinoma infiltrante.

LUMINAL, TRIPLE NEGATIVO, HER2 - CARCINOMA INFILTRANTE			
	<i>Frecuencia</i>	<i>Porcentaje</i>	<i>Porcentaje acumulado</i>
LUMINAL	431	83,0	83,0
TRIPLE NEGATIVO	40	7,7	90,8
HER2	48	9,2	100,0
Total	519	100,0	

8. CLASIFICACIÓN DE St. GALLEN EN GRUPOS DE RIESGO.

Categorizamos 657 tumores infiltrantes según la clasificación de St. Gallen en grupos de riesgo de recidiva, de la siguiente manera: tumores de bajo riesgo, 18,7% - tumores de tamaño inferior o igual a 10 mm, de grado 1 o 2, y con RE+ y/o RP+ -, tumores de riesgo medio, 35,8% - tumores de entre 10-20 mm, de grado 1 o 2, y con RE+ y/o RP+ - y tumores de riesgo alto, 45,5% - tumores de más de 20 mm, o de grado 3, o con ambos receptores hormonales negativos – (Tabla 26).

Tabla 26: Frecuencias y porcentajes de los tumores clasificados según la clasificación de riesgo de St. Gallen, en la serie de carcinoma infiltrante.

RIESGO - CARCINOMA INVASIVO			
	<i>Frecuencia</i>	<i>Porcentaje</i>	<i>Porcentaje acumulado</i>
RIESGO BAJO	123	18,7	18,7
RIESGO MEDIO	235	35,8	54,5
RIESGO ALTO	299	45,5	100,0
Total	657	100,0	

9. LINFADENECTOMÍAS.

Por positividad en el estudio del ganglio centinela, se realizó linfadenectomía en 69 pacientes (9,9%). En el 73,9% de los casos, el único ganglio positivo detectado fue el ganglio centinela. En el 26,1% de los casos se detectaron ganglios positivos adicionales al ganglio centinela (un ganglio adicional en el 7,25% de los casos, dos ganglios adicionales en el 4,35%, 3 ganglios adicionales en el 10,14%, y más de 3 ganglios (4, 6 o 14) en 4,35%). La media de ganglios examinados en la linfadenectomía es de $19,32 \pm 5,05$. El tamaño de las metástasis oscila, entre los 0,1 y los 17 mm, siendo el tamaño medio, 3,34 mm.

El 18% de los casos con linfadenectomía presentan permeación vascular y el 73,1%, no.

El 5,9% de los casos corresponden a tumores de riesgo bajo, el 36,8% de riesgo medio, y el 57,4% de riesgo elevado.

B. CARCINOMA IN SITU Y MICROINVASIVOS.

Estudiamos en esta serie 87 tumores dentro de la categoría de carcinomas in situ y microinvasivos (MIC). El 81,6% de estos casos corresponden a DCIS, el 16,1% a MIC (se ha segregado del grupo de DCIS por su excelente pronóstico), el 1,1% a LCIS y el restante 1,1% a carcinoma papilar intraquístico (Tabla 27).

Tabla 27: Frecuencias y porcentajes de los tipos de carcinomas in situ y microinvasivos.

	<i>Frecuencia</i>	<i>Porcentaje</i>	<i>Porcentaje válido</i>	<i>Porcentaje acumulado</i>
<i>DCIS</i>	71	81,6	81,6	81,6
<i>LCIS</i>	1	1,1	1,1	82,8
<i>MIC</i>	14	16,1	16,1	98,9
<i>PAPILAR INTRAQUÍSTICO</i>	1	1,1	1,1	100,0
<i>Total</i>	87	100,0	100,0	

1. ESTADIFICACIÓN TNM.

1.1. ESTADIFICACIÓN "pT" (TUMORAL).

El 16,1% de los casos estudiados son tumores pT1mic (con microinvación inferior a 0,1 cm en su mayor dimensión) y el 83,9% son pTis (Tabla 28).

Tabla 28: Frecuencia y porcentaje de los tamaños tumorales en función de la estadificación pT, en la serie de carcinomas in situ y microinvasivos.

	<i>Frecuencia</i>	<i>Porcentaje</i>	<i>Porcentaje válido</i>	<i>Porcentaje acumulado</i>
<i>pT1mic</i>	14	16,1	16,1	16,1
<i>pTis</i>	73	83,9	83,9	100,0
<i>Total</i>	87	100,0	100,0	

1.2. ESTADIFICACIÓN "pN" (GANGLIONAR).

En el 81,6% de los casos estudiados no se detectó enfermedad en la evaluación del ganglio centinela - pN0(sn) -, un 16,1% de los casos se clasificaron como pN0(mol+)(sn) y un 2,3% como pN1a(sn) (Tabla 29).

Tabla 29: Frecuencias y porcentajes del estado axilar en función de la estadificación pN, en la serie de carcinoma in situ y microinvasivo.

pN - CARCINOMA IN SITU Y MICROINVASIVO

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
pN0	71	81,6	81,6	81,6
pN0(mol+)	14	16,1	16,1	97,7
pN1a	2	2,3	2,3	100,0
Total	87	100,0	100,0	

La población de carcinoma in situ presenta un 86,3% de casos negativos y el restante 16,7% es positivo exclusivamente por PCR, pN0(mol+)(sn) (Tabla 30).

Tabla 30: Frecuencias y porcentajes del estado axilar en función de la estadificación pN, en la serie de carcinoma in situ.

pN - CARCINOMA IN SITU

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
pN0	63	86,3	86,3	86,3
pN0(mol+)	10	13,7	13,7	100,0
Total	73	100,0	100,0	

En la población de carcinoma microinvasivos, el 57,1% de los casos son negativos, pN0, el 28,6% resultaron positivos mediante PCR, pN0(mol+)(sn) y se detectaron metástasis en 2 casos (14,3%), pN1a(sn) (Tabla 31).

Tabla 31: Frecuencias y porcentajes del estado axilar en función de la estadificación pN, en la serie de carcinoma microinvasivo.

pN - CARCINOMA MICROINVASIVO

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
pN0	8	57,1	57,1	57,1
pN0(mol+)	4	28,6	28,6	85,7
pN1a	2	14,3	14,3	100,0
Total	14	100,0	100,0	

2. PERMEACIÓN VASCULAR.

No se detectó permeación vascular en ninguno de estos tumores.

3. TUMORES MULTICÉNTRICOS Y CONTRALATERALES.

Se detectaron dos tumores multicéntricos y un tumor contralateral al momento del diagnóstico, en el grupo de los carcinomas intraductales.

4. GRADO TUMORAL.

El 22,2% de los carcinomas intraductales son de grado bajo, y el 77,8% de grado alto (Tabla 32).

Tabla 32: Frecuencias y porcentajes del grado histológico tumoral, en la serie de carcinoma in situ.

GRADO - CARCINOMA INTRADUCTAL				
	<i>Frecuencia</i>	<i>Porcentaje</i>	<i>Porcentaje válido</i>	<i>Porcentaje acumulado</i>
ALTO	56	77,8	77,8	81,6
BAJO	16	22,2	22,2	100,0
Total	72	100,0	100,0	

En los carcinomas microinvasivos, el 14,3% eran de grado tumoral 1, el 28,6% de grado tumoral 2 y el 57,1% de grado tumoral 3 (Tabla 33).

Tabla 33: Frecuencias y porcentajes del grado histológico tumoral, en la serie de carcinoma microinvasivo.

GRADO - CARCINOMA MIROINVASIVO				
	<i>Frecuencia</i>	<i>Porcentaje</i>	<i>Porcentaje válido</i>	<i>Porcentaje acumulado</i>
1	2	14,3	14,3	14,3
2	4	28,6	28,6	42,9
3	8	57,1	57,1	100,0
Total	14	100,0	100,0	

5. RECEPTORES HORMONALES E ÍNDICE PROLIFERATIVO.

Se dispone información sobre la expresión de los receptores hormonales sólo en 29 casos de carcinoma in situ.

El 69% de los tumores son positivos para la expresión del RE y el 31% son negativos (Tabla 34).

Tabla 34: Frecuencias y porcentajes de la expresión IHQ del RE en el tumor primario, en la serie de carcinoma in situ.

RE - CARCINOMA INTRADUCTAL

	<i>Frecuencia</i>	<i>Porcentaje</i>	<i>Porcentaje acumulado</i>
NEGATIVO	9	31,0	31,0
POSITIVO	20	69,0	100,0
Total	29	100,0	

El 51,7% de los tumores son positivos para la expresión del RP y el 48% son negativos (Tabla 35).

Tabla 35: Frecuencias y porcentajes de la expresión IHQ del RP en el tumor primario, en la serie de carcinoma in situ.

RP - CARCINOMA INTRADUCTAL

	<i>Frecuencia</i>	<i>Porcentaje</i>	<i>Porcentaje acumulado</i>
NEGATIVO	14	48,3	48,3
POSITIVO	15	51,7	100,0
Total	29	100,0	

En la serie de tumores microinvasivos, se dispone información sobre el estado de los receptores hormonales en 13 tumores. El porcentaje de positividad es del 76,9% para RE y del 38,5% para RP (Tabla 36 y 37).

Tabla 36: Frecuencias y porcentajes de la expresión IHQ del RE en el tumor primario, en la serie de carcinoma microunvasivo.

RE - CARCINOMA MICROINVASIVO

	<i>Frecuencia</i>	<i>Porcentaje</i>	<i>Porcentaje acumulado</i>
NEGATIVO	3	23,1	23,1
POSITIVO	10	76,9	100,0
Total	13	100,0	

Tabla 37: Frecuencias y porcentajes de la expresión IHQ del RP en el tumor primario, en la serie de carcinoma microinvasivo.

RP - CARCINOMA MICROINVASIVO

	<i>Frecuencia</i>	<i>Porcentaje</i>	<i>Porcentaje acumulado</i>
<i>NEGATIVO</i>	8	61,5	61,5
<i>POSITIVO</i>	5	38,5	100,0
<i>Total</i>	13	100,0	

En el caso de la expresión de la proteína ki67, se estudiaron 8 casos, mostrando alto índice proliferativo (expresión inmunohistoquímica superior al 25%) el 25% de los casos.

Tabla 38: Frecuencias y porcentajes de la expresión IHQ del Ki67 en el tumor primario, en la serie de carcinoma microinvasivo.

KI67 -CARCINOMA MICROINVASIVO

	<i>Frecuencia</i>	<i>Porcentaje</i>	<i>Porcentaje acumulado</i>
<i>NEGATIVO</i>	6	75,0	75,0
<i>POSITIVO</i>	2	25,0	100,0
<i>Total</i>	8	100,0	

6. CLASIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS TUMORES.

Se disponen sólo de datos completos sobre 7 tumores microinvasivos por lo que se omite su estudio (Tabla 39).

Tabla 39: Frecuencias y porcentajes de los tipos tumorales luminal y HER2, en la serie de carcinoma microinvasivos.

LUMINAL, TRIPLE NEGATIVO, HER2 - CARCINOMA MICROINVASIVO

	<i>Frecuencia</i>	<i>Porcentaje</i>	<i>Porcentaje válido</i>	<i>Porcentaje acumulado</i>
<i>LUMINAL</i>	5	35,7	71,4	71,4
<i>HER2</i>	2	14,3	28,6	100,0
<i>Total</i>	7	50,0	100,0	

7. CLASIFICACIÓN DE ST. GALLEN EN GRUPOS DE RIESGO.

La clasificación de riesgo de recidiva, en función del grado tumoral o de la expresión de receptores hormonales, se pudo aplicar sobre 12 tumores microinvasivos. El 25% resultaron de bajo riesgo y el 75% de elevado (Tabla 40).

Tabla 40: Frecuencias y porcentajes de los tumores clasificados según la clasificación de riesgo de St. Gallen, en la serie de carcinoma microinvasivo.

RIESGO - CARCINOMA MICROINVASIVO

		<i>Frecuencia</i>	<i>Porcentaje</i>	<i>Porcentaje acumulado</i>
	<i>RIESGO BAJO</i>	3	25,0	25,0
	<i>RIESGO ALTO</i>	9	75,0	100,0
	<i>Total</i>	12	100,0	

2. ANÁLISIS DE LAS TÉCNICAS RT-PCR.

2.1. ESTUDIO INICIAL DE COMPARACIÓN RT-PCR ESTÁNDAR Y RT-PCR REAL TIME.

En una primera fase, se comparó el resultado de la RT-PCR convencional con la RT-PCR Real-Time (plataforma Roche), con el objetivo de estudiar los niveles de expresión dentro de los pN0 y pN0(mol+).

El resultado para la RT-PCR clásica fue el siguiente: 71 ganglios resultaron negativos (66,4%) y los 36 ganglios restantes (33,6%) mostraron expresión de KRT19, al someter el producto amplificado a electroforesis en gel de acrilamida.

En la evaluación mediante RT-PCR Real Time, todas las muestras mostraron cierto nivel de expresión de KRT19. Los rangos normalizados de la KRT19 frente la B2M oscilaron entre $3,7E^{-06}$ y $2,6E^{-01}$.

Se eligió un ganglio metastático como control, con un valor de expresión normalizado de $1,2E^{-03}$.

En el grupo de ganglios negativos mediante estudio anatomopatológico (H&E, cortes seriados e IHQ), 92 muestras, se diferenciaron dos grupos, según el resultado de la RT-PCR convencional (negativo y positivo). Los ganglios negativos para la RT-PCR clásica, muestran mediante la RT-PCR Real Time, los valores de expresión normalizados, más bajos (media de valores 60,92 veces inferior) al ser comparados con el control positivo, mientras que los ganglios positivos mediante RT-PCR clásica, muestran valores de expresión, mediante RT-PCR Real Time, más próximos (media de valores 30,26 veces inferior) al control positivo. La media de los valores normalizados fue $1,2E^{-04}$ para las muestras con RT-PCR clásica negativa y de $9,9E^{-03}$ para las muestras positivas.

El análisis de los niveles de expresión de KRT19 en este grupo de muestras (ganglios negativos mediante histopatología pero con resultado divergente mediante RT-PCR clásica) es

capaz de confirmar mediante RT-PCR Real Time, la existencia de dos poblaciones, con niveles de expresión distintos, este resultado es estadísticamente significativo - test Mann-Whitney, $p < 0,038$ - (Tabla 41).

Tabla 41: Resultado de la prueba de suma de rangos de Mann-Whitney. Comparación de las medias de los niveles de expresión (*Real-time*) de las muestras pN0 y pN0(mol+) (RT-PCR clásica).

Rangos

RT-PCR CLÁSICA		<i>N</i>	<i>Rango promedio</i>	<i>Suma de rangos</i>
<i>CK NORMALIZADA</i>	<i>NEGATIVO</i>	71	43,37	3079,00
	<i>POSITIVO</i>	21	57,10	1199,00
	<i>Total</i>	92		

Estadísticos de contraste^a

	<i>CK NORMALIZADA</i>
<i>U de Mann-Whitney</i>	523,000
<i>W de Wilcoxon</i>	3079,000
<i>Z</i>	-2,070
<i>Sig. asintót. (bilateral)</i>	,038

a. Variable de agrupación: RT-PCR CLÁSICA

2.2. ESTUDIO INICIAL DE COMPARACIÓN RT-PCR Y ANALISIS ANATOMOPATOLÓGICO.

Se comparó la técnica histopatológica estándar, con la RT-PCR clásica y la RT-PCR Real Time, sobre la serie de control (107 ganglios centinela en el caso de la RT-PR clásica y de 109 ganglios en la RT-PCR Real Time).

En el análisis rutinario histopatológico, 92 ganglios (84,4%), se clasificaron como negativos. En este grupo de muestras, la inmunohistoquímica, mediante Cam 5.2, reveló un 5,5% de ganglios que mostraban células aisladas, sobre todo en la periferia del ganglio. El resto de los ganglios, 11 (10,1%), se consideraron positivos, con depósitos de células tumorales

detectadas tanto por tinción mediante H&E, como mediante IHQ - en el momento de este estudio el pN1mi no costaba en el TNM vigente, edición - (Tabla 42).

Tabla 42: Frecuencias y porcentajes de la evaluación anatomopatológica del GC en la serie de control.

RESULTADO ANATOMOPATOLÓGICO				
	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
pN0	92	84,4	84,4	84,4
pN0(i+)	6	5,5	5,5	89,9
pN1a	11	10,1	10,1	100,0
Total	109	100,0	100,0	

En la comparación de la técnica de RT-PCR clásica con la rutina histológica. 2 casos no fueron valorables mediante PCR clásica, 71 ganglios (66,4%) fueron negativos, los restantes 36 (33,6%) se consideraron positivos (Tabla 43). Todos los ganglios con resultado positivo mediante técnicas histopatológicas, fueron confirmados mediante RT-PCR. Además se detectó un incremento en la detección de positividad, 21 ganglios que habían resultado negativos para inmunohistoquímica, fueron positivos mediante técnica molecular. El análisis estadístico mediante la prueba de la ji-cuadrado, nos indica que existen diferencias significativas entre los grupos de muestras analizadas mediante RT-PCR clásica (muestras positivas y negativas) al ser comparado con el resultado anatomopatológico ($p < 4,5E^{-09}$).

Tabla 43: Tabla de contingencia comparativa de los resultados del estudio anatomopatológico y la RT-PCR clásica.

Recuento		ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO		Total
		NEGATIVO	POSITIVO	
RT-PCR CLÁSICA	NEGATIVO	71		71
	POSITIVO	21	15	36
Total		92	15	107

Se compararon los valores normalizados de KRT19, agrupando las muestras en función del estado de los ganglios determinados mediante estudio rutinario histopatológico. Los valores medios normalizados de expresión para las categorías de pN0(sn), pN0(i+)(sn) y pN1a(sn) fueron los siguientes: $1,7E^{-04}$, $4,2E^{-04}$ y $3,2E^{-02}$. Las muestras negativas exhiben valores más

bajos y a medida que aumenta la positividad, aumenta el valor medio de expresión. El estudio estadístico mediante pruebas no paramétricas de Mann-Whitney, nos indica que existen diferencias entre las medias de los valores de KRT normalizada en función de si son positivas o negativas en el estudio anatomopatológico ($p < 1,9E^{-06}$) (Tabla 44).

Tabla 44: Resultado de la prueba de suma de rangos de Mann-Whitney. Comparación de las medias de los niveles de expresión (*Real-time*) de las muestras pN0(sn), pN0(i+)(sn) y pN1a (sn) en la serie de control.

		Rangos		
ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO		N	Rango promedio	Suma de rangos
CK NORMALIZADA	NEGATIVO	92	48,80	4490,00
	POSITIVO	17	88,53	1505,00
	Total	109		

Estadísticos de contraste ^a

	CK NORMALIZADA
U de Mann-Whitney	212,000
W de Wilcoxon	4490,000
Z	-4,760
Sig. asintót. (bilateral)	1,9E-06

a. Variable de agrupación: ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO

Con el objetivo de excluir falsos positivos o niveles de expresión muy bajos sin significado clínico, se utilizó como punto de corte la media de los valores normalizados de los ganglios clasificados como pN0(sn) ($1,7E^{-04}$). Los valores por encima de este punto se consideraron positivos. Quedó así establecido el punto de corte para la plataforma Roche.

En la comparación entre el examen histopatológico y la RT-PCR Real Time, se clasificaron: 73 muestras negativas mediante ambos métodos, 4 muestras negativas mediante RT-PCR y positivas en el examen histológico, 13 muestras positivas mediante ambos métodos y 19 muestras positivas exclusivamente mediante RT-PCR. Esto supone un incremento en la positividad de un 15,6%. . El análisis estadístico mediante la prueba de la ji-cuadrado, nos indica que existen diferencias significativas entre los grupos de muestras analizadas mediante *Real-Time* RT-PCR (muestras positivas y negativas) al ser comparado con el resultado anatomopatológico ($p < 3,4E^{-06}$).

Tabla 45: Tabla de contingencia comparativa de los resultados del estudio anatomopatológico y la *Real-Time* RT-PCR (Tabla 45).

		ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO		Total
		NEGATIVO	POSITIVO	
RT-PCR REAL TIME	NEGATIVO	73	4	77
	POSITIVO	19	13	32
Total		92	17	109

2.3. ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE DISTINTAS PLATAFORMAS REAL TIME.

Se han comparado mediante estudio estadístico de pruebas no paramétricas de Mann-Whitney, las dos plataformas disponibles. El resultado nos indica que existen diferencias entre las medias de los valores de KRT normalizada, los ganglios negativos mediante análisis anatomopatológico, muestran medias inferiores a los valores de los ganglios positivos. Los resultados resultan estadísticamente significativos en ambas plataformas (plataforma Roche $p < 9,1E^{-21}$, plataforma Applied $p < 0,001$).

Tabla 46: Resultado de la prueba de suma de rangos de Mann-Whitney. Comparación de las medias de los niveles de expresión de las muestras según el resultado anatomopatológico, en las diferentes plataformas *Real-time*.

		N	Rango promedio	Suma de rangos
PLATAFORMA ROCHE	ANATOMIA PATOLOGICA NEGATIVO	405	219,99	89096,50
	POSITIVO	91	375,38	34159,50
	Total	496		
PLATAFORMA APPLIED	NEGATIVO	98	51,97	5093,50
	POSITIVO	12	84,29	1011,50
	Total	110		

Estadísticos de contraste ^a

	MAXLC	MAXAPA
U de Mann-Whitney	6881,500	242,500
W de Wilcoxon	89096,500	5093,500
Z	-9,346	-3,313
Sig. asintót. (bilateral)	9,1E-21	,001

a. Variable de agrupación: ANATOMIA PATOLOGICA

Se realizó el análisis de curvas ROC, para estudiar la sensibilidad y especificidad de la técnica de la RT-PCR Real-time (Roche) considerando la técnica anatomopatológica como *gold standard*. La capacidad predictiva depende de la capacidad del modelo para discriminar los verdaderos positivos y es el área bajo la curva ROC.

El área bajo la curva es de 0,813, lo que significa que una muestra seleccionada al azar entre el grupo de muestras positivas, tiene un valor de la prueba mayor (capacidad de discernir el verdadero positivo), que uno seleccionado aleatoriamente del grupo de muestras negativas en el 81,3% de las veces (Tabla 47).

Mediante una prueba de hipótesis y/o de la estimación del intervalo de confianza para el área, podemos evaluar la precisión de un proceder diagnóstico. Rechazar la hipótesis de que el área teórica es igual a 0,5 ($p < 0,05$ y/o intervalo de confianza que no contiene al 0,5), proporciona evidencia de que la prueba diagnóstica tiene la habilidad para distinguir entre los 2 subgrupos.

Tabla 47: Área bajo la curva ROC. Evaluación de la plataforma *Lightcycler* (Roche) como método de detección de afectación ganglionar.

Resumen del proceso de casos

ANATOMIA PATOLOGICA	<i>N válido (según lista)</i>
<i>Positivo^a</i>	91
<i>Negativo</i>	405

Los valores mayores en la variable de resultado de contraste indican una mayor evidencia de un estado real positivo.

a.El estado real positivo es 1

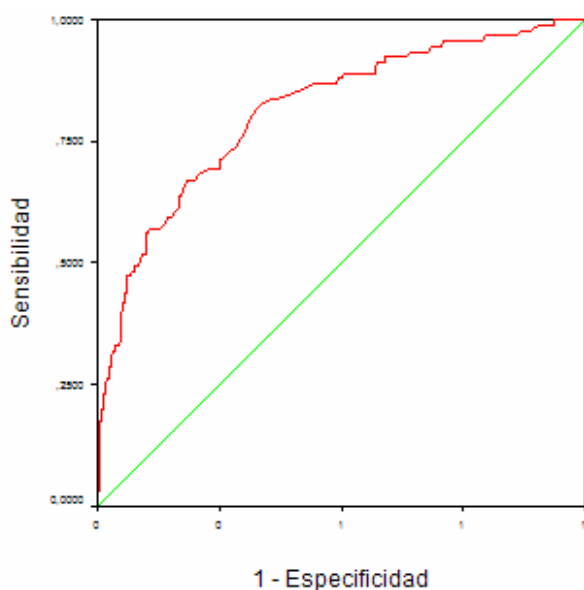
Área bajo la curva

Variables resultado de contraste: MAXLC

Área	Error típ. ^a	Sig. asintótica ^b	Intervalo de confianza asintótico al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
,813	,026	9,2E-21	,762	,864

La variable (o variables) de resultado de contraste: MAXLC tiene al menos un empate entre el grupo de estado real positivo y el grupo de estado real negativo. Los estadísticos pueden estar sesgados.

- Bajo el supuesto no paramétrico
- Hipótesis nula: área verdadera = 0,5



Los segmentos diagonales son producidos por los empates.

Gráfico 4: Curva ROC. Evaluación de la plataforma *lightcycler* (Roche) para la detección de afectación axilar.

Para la plataforma Applied, el número de muestras examinado para construir la curva ROC fue menor. El área determinada bajo la curva fue de 0,794 y es capaz de discernir entre los dos grupos. Los intervalos de confianza no contienen al 0,5 y la significación fue de $p=0,001$ (Tabla 48).

Tabla 48: Área bajo la curva ROC. Evaluación de la plataforma Applied como método de detección de afectación ganglionar.

Resumen del proceso de casos

ANATOMIA PATOLOGICA	<i>N válido (según lista)</i>
<i>Positivo^a</i>	12
<i>Negativo</i>	98

Los valores mayores en la variable de resultado de contraste indican una mayor evidencia de un estado real positivo.

a. El estado real positivo es 1.

Área bajo la curva

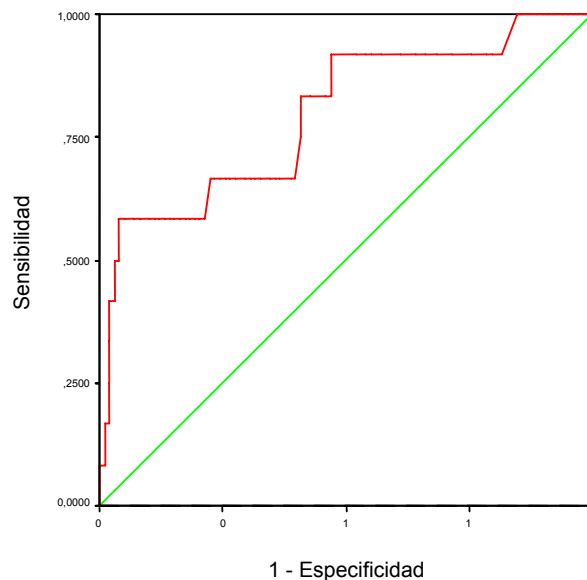
Variables resultado de contraste: MAXAPA

Área	Error típ. ^a	Sig. asintótica ^b	Intervalo de confianza asintótico al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
,794	,076	,001	,644	,944

La variable (o variables) de resultado de contraste: MAXAPA tiene al menos un empate entre el grupo de estado real positivo y el grupo de estado real negativo. Los estadísticos pueden estar sesgados .

a. Bajo el supuesto no paramétrico

b. Hipótesis nula: área verdadera = 0,5



Los segmentos diagonales son producidos por los empates.

Gráfico 5: Curva ROC. Evaluación de la plataforma Applied para la detección de afectación axilar.

Con el fin de estudiar los valores mínimos de expresión en muestras sin afectación tumoral, se emplearon los casos de lesiones benignas (sospecha citológica de "atípias"). Mediante la plataforma Roche, la media de los valores normalizados es de $7E^{-05}$ y con la plataforma Applied de $3,6E^{-04}$ (Tabla 49).

Tabla 49: Niveles de expresión de las lesiones benignas en las plataformas *Real-time*.

Estadísticos descriptivos - LESIONES BENIGNAS

	<i>N</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. típ.</i>
PLATAFORMA ROCHE	7	2,6E-05	1,1E-04	7,0E-05	3,1E-05
PLATAFORMA APPLIED	4	1,7E-04	7,0E-04	3,6E-04	2,5E-04

La media de los valores negativos y positivos mediante detección molecular, en ambas plataformas fueron las siguientes (Tabla 50 y 51):

Tabla 50: Niveles medios de expresión de las muestras analizadas mediante plataforma Roche.

Informe

ROCHE

PCR	<i>Media</i>	<i>N</i>	<i>Desv. típ.</i>
NEGATIVO	1,1E-04	309	4,3E-04
POSITIVO	3,2E-02	187	1,6E-01
<i>Total</i>	1,2E-02	496	1,0E-01

Quedó establecido el punto de corte para la plataforma Applied en $1,3 E^{-03}$, por encima de este valor las muestras son consideradas positivas.

Tabla 51: Niveles medios de expresión de las muestras analizadas mediante plataforma Applied.

Informe

APPLIED

PCR	<i>Media</i>	<i>N</i>	<i>Desv. típ.</i>
NEGATIVO	1,3E-03	101	7,7E-03
POSITIVO	3,0E-02	9	3,6E-02
<i>Total</i>	3,7E-03	110	1,5E-02

La media de los valores para ambas plataformas en función del resultado histopatológico fueron los siguientes (Tabla 52):

Tabla 52: Niveles medios de expresión de las muestras analizadas en ambas plataformas en función del resultado anatómico patológico.

Informe

ROCHE

ANATOMIA PATOLOGICA	<i>Media</i>	<i>N</i>	<i>Desv. típ.</i>
NEGATIVO	2,4E-03	405	4,0E-02
POSITIVO	5,6E-02	91	2,2E-01
Total	1,2E-02	496	1,0E-01

Informe

APPLIED

ANATOMIA PATOLOGICA	<i>Media</i>	<i>N</i>	<i>Desv. típ.</i>
NEGATIVO	1,8E-03	98	9,1E-03
POSITIVO	1,9E-02	12	3,3E-02
Total	3,7E-03	110	1,5E-02

Si observamos en forma de histograma como se distribuyen las muestras en función de los valores normalizados de KRT19, según su pN, observamos una tendencia a aumentar la media de los valores a nivel que aumenta el tamaño de la metástasis (Gráfico 6).

Las medias entorno a las que se distribuyen las muestras, son las siguientes: para los ganglios centinela pN0: $1,0E^{-04}$, para los pN0(mol+): $8,0E^{-03}$, para los casos pN0(i+): $3,6E^{-02}$, para los pN1mi: $8,4E^{-02}$ y para los pN1a: $5,2E^{-02}$.

El escaso número de muestras positivas pN1mi y pN1a (6) realizadas con la plataforma Applied, no permite mostrar esta tendencia.

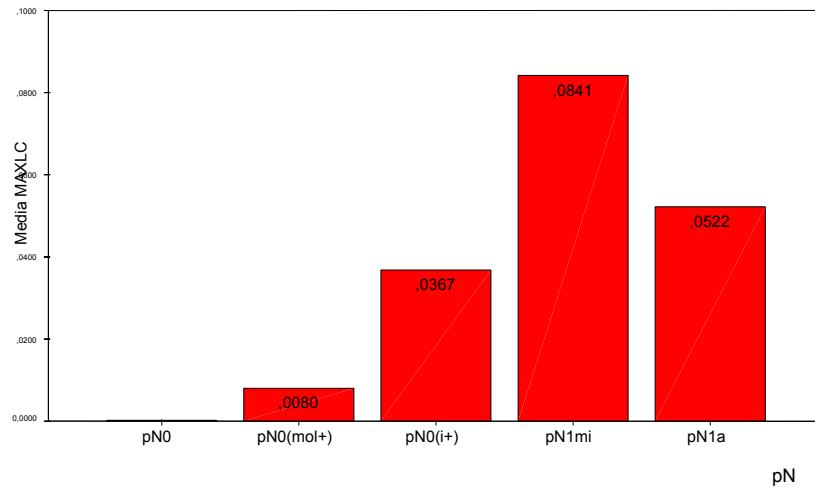


Gráfico 6: Histograma de las medias de los niveles de expresión en función de la estadificación axilar.

2.4. ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE DISTINTOS MÉTODOS DE NORMALIZACIÓN.

Se evaluaron dos métodos de normalización de datos generados por la plataforma Roche, en el primero se utilizaron las pendientes de la recta patrón generado por los valores Ct de una serie de muestras de concentración conocida, con el fin de estimar la eficiencia de la reacción para cada gen, y estimar la concentración para cada muestra problema en función de dicha eficiencia. Y en el segundo caso se utilizó el programa *LinReg* para calcular la eficiencia de cada reacción individual a partir de la parte lineal-logarítmica de cada muestra problema, se utilizó la regresión lineal, para calcular la recta que más se ajusta, la concentración inicial se calcula a partir del valor de intersección de la recta de regresión.

Se estudiaron 196 reacciones de RT-PCR. 137 muestras resultaron negativas por técnicas de rutina patológica, la media de los valores de expresión fue de $3,6E^{-4}$ para la técnica convencional de recta patrón (asunción de que todas las reacciones tienen la misma eficiencia) y de $8,94E^{-4}$ para el método de diferente eficiencia individual de la muestra. 59 muestras resultaron positivas por técnicas de rutina patológica, los valores medios de expresión fueron de $4,3E^{-2}$ para asunción de misma eficiencia y de $1,4E^{-2}$ para eficiencia individual de cada muestra (Tabla 53).

Tabla 53: Medias de los valores de expresión de las muestras analizadas mediante estudio anatomopatológico en función del método de normalización empleado.

Medias de los valores de expresión			
APA		RECTA PATRÓN	LINREG
NEGATIVO	Media	3,6E-04	8,9E-04
	Desv. típ.	1,7E-03	2,2E-03
	N	137	137
POSITIVO	Media	4,3E-02	1,4E-02
	Desv. típ.	,2	4,0E-02
	N	59	59

Se han comparado mediante estudio estadístico de pruebas no paramétricas de Mann-Whitney, los dos métodos disponibles. El resultado nos indica que existen diferencias entre las

medias de los valores de KRT normalizada, los ganglios negativos mediante análisis anatomopatológico, muestran medias inferiores a los valores de los ganglios positivos. Los resultados resultan estadísticamente significativos con ambos métodos - método misma eficiencia $p < 1,9E^{-19}$, método diferente eficiencia $p < 5,1E^{-15}$ – (Tabla 54).

Tabla 54: Resultado de la prueba de suma de rangos de Mann-Whitney. Comparación de las medias de los niveles de expresión según resultado anatomopatológico en los diferentes métodos de normalización).

Rangos				
	APA	N	Rango promedio	Suma de rangos
RECTA PATRÓN	NEGATIVO	137	74.53	10210.00
	POSITIVO	59	154.17	9096.00
	Total	196		
LINREG	NEGATIVO	137	77.72	10647.00
	POSITIVO	59	146.76	8659.00
	Total	196		

Estadísticos de contraste ^a		
	RECTA PATRÓN	LINREG
U de Mann-Whitney	757.000	1194.000
W de Wilcoxon	10210.000	10647.000
Z	-9,017	-7,817
Sig. asintót. (bilateral)	1.9E-19	5.4E-15

a. Variable de agrupación: APA

Se realizó el análisis de curvas ROC, para estudiar la eficiencia y sensibilidad los dos métodos de normalización utilizados considerando la técnica anatomopatológica como *gold standard*. El área bajo la curva es de 0,906 - misma eficiencia - y 0,852 - diferente eficiencia – (Tabla 55).

Mediante una prueba de hipótesis y/o de la estimación del intervalo de confianza para el área, podemos evaluar la precisión de un proceder diagnóstico. Rechazar la hipótesis de que el área teórica es igual a 0,5 ($p < 0,05$ y/o intervalo de confianza que no contiene al 0,5), proporciona evidencia de que la prueba diagnóstica tiene la habilidad para distinguir entre los 2 subgrupos.

Tabla 55: Área bajo la curva ROC. Evaluación de los diferentes métodos de normalización, recta patrón y LinReg.

Resumen del proceso de casos

APA	N válido (según lista)
Positivo ^a	59
Negativo	137

Los valores mayores en la variable de resultado de contraste indican una mayor evidencia de un estado real positivo.

a. El estado real positivo es 1.

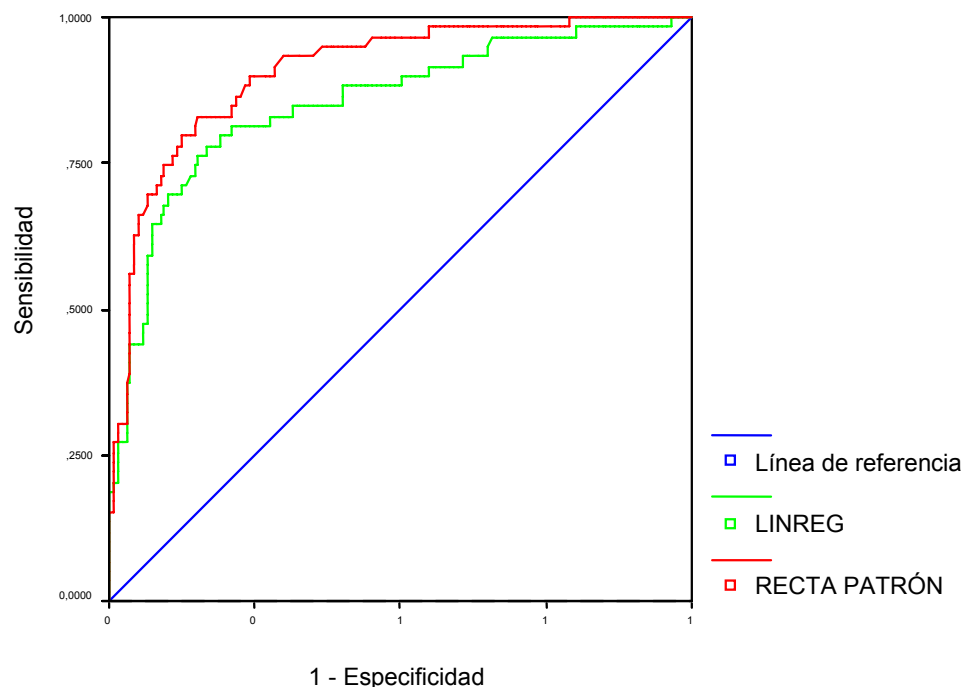
Área bajo la curva

Variables resultado de contraste	Área	Error típ. ^a	Sig. asintótica ^b	Intervalo de confianza asintótico al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
RECTA PATRÓN	,906	,023	1,9E-19	,861	,952
LINREG	,852	,032	5,4E-15	,790	,915

La variable (o variables) de resultado de contraste: RECTA PATRÓN, LINREG tiene al menos un empate entre el grupo de estado real positivo y el grupo de estado real negativo. Los estadísticos pueden estar sesgados .

a. Bajo el supuesto no paramétrico

b. Hipótesis nula: área verdadera = 0,5



Los segmentos diagonales son producidos por los empates.

Gráfico 7: Curvas ROC. Evaluación de los dos métodos de normalización empleados, recta patrón y LinReg.

Se estudió la variabilidad entre réplicas de la misma muestra realizadas en experimentos diferentes. Se estudiaron dos muestras control, sobre las que se realizaron 11 y 12 experimentos de replica completos (retrotranscripción y amplificación). Se calcularon los valores normalizados para ambos controles por los dos métodos mencionados. La media de expresión para el control 1 fue de $4,7E^{-3}$ para el método de recta patrón y de $9,9E^{-3}$ para el método de eficiencias individuales (la desviación estándar fue respectivamente de $5,2E^{-3}$ y de $1,0E^{-2}$). La media de expresión para el control 2 fue de $1,8E^{-3}$ para el método de recta patrón y de $3,5E^{-3}$ para el método de eficiencias individuales - la desviación estándar fue respectivamente de $2,5E^{-3}$ y de $1,3E^{-3}$ - (Tabla 56).

Tabla 56: Variabilidad entre replicas empleado métodos de normalización distintos.

REPLICAS		RECTA PATRÓN	LINREG
CONTROL 1	Media	4,7E-03	9,9E-03
	Desv. típ.	5,2E-03	1,0E-02
	N	11	11
CONTROL 2	Media	1,8E-03	3,5E-03
	Desv. típ.	2,5E-03	1,3E-03
	N	12	12
Total	Media	3,2E-03	6,6E-03
	Desv. típ.	4,2E-03	7,8E-03
	N	23	23

Representación gráfica mediante barras de error con intervalos de confianza del 95%, comparando los dos grupos de muestras (Gráfico 8)

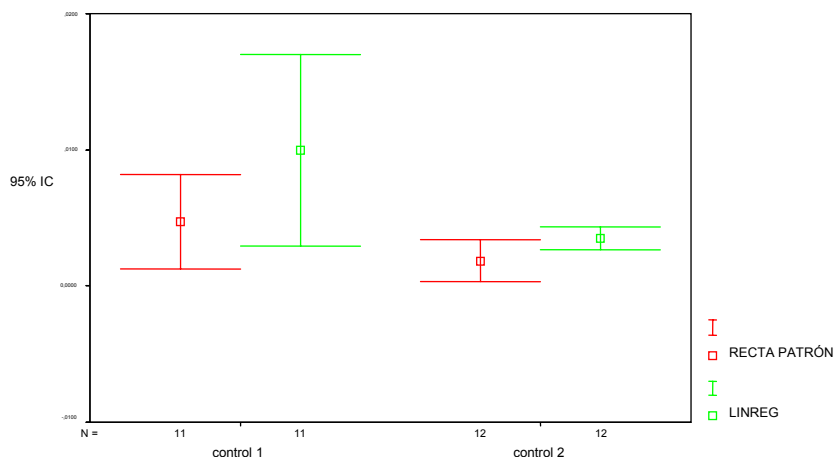


Gráfico 8: Barras de error de la variabilidad entre replicas utilizando los dos métodos de normalización.

3. RESULTADOS PCR COMPARATIVA CON APA.

1. SERIE GLOBAL.

La serie global incluye 795 pacientes con tumorectomía y ganglio centinela.

Se consideraron tres variables dicotómicas frente a las que contrastar los resultados obtenidos. La primera variable es Anatomía Patológica (AP), recoge los resultados histológicos según las técnicas anatomopatológicas rutinarias (H&E e inmunohistoquímica), la segunda variable, PCR recoge los resultados del análisis molecular, y la tercera variable que se denominó Evaluación Total (ET), recoge todas las muestras positivas independientemente de la técnica empleada.

A efectos estadísticos, en el caso de pacientes con más de un ganglio centinela se consideró el valor de expresión más elevado de entre todos los ganglios analizados de dicha paciente.

En la serie global el porcentaje de muestras positivas mediante técnicas anatomopatológicas es del 17,2%, mediante técnicas moleculares es del 33,1%. Si utilizamos la tercera variable, que rescate los falsos negativos producidos por las dos técnicas, el porcentaje de positividad es del 35,6% (Tabla 57).

Tabla 57: Frecuencias y porcentajes de la detección de afectación del GC, en la serie global.

	ANATOMIA PATOLOGICA		PCR		EVALUACIÓN TOTAL	
	Recuento	%	Recuento	%	Recuento	%
NEGATIVO	658	82,8%	532	66,9%	512	64,4%
POSITIVO	137	17,2%	263	33,1%	283	35,6%

Se comprobó mediante el test de la ji-cuadrado que los resultados de la RT-PCR (estándar y *Real-Time*) diferencian claramente dos grupos (muestras positivas y negativas) al ser comparado con las técnicas histopatológicas de evaluación de micrometástasis en ganglios centinela de mama - cortes seriados, e IHQ - , $p < 2,0E^{-46}$ (Tabla 58).

Tabla 58: Tabla de contingencia comparativa de los resultados del estudio anatomopatológico y la RT-PCR, en la serie global.

		ANATOMIA PATOLOGICA		Total
		NEGATIVO	POSITIVO	
RT-PCR	NEGATIVO	512	20	532
	POSITIVO	146	117	263
Total		658	137	795

En la serie global, la técnica de la PCR, muestra una mayor sensibilidad en la detección de niveles de expresión de KRT19, con un incremento en la positividad del 15,9%, respecto a las técnicas anatomopatológicas. El porcentaje de falsos negativos es del 4% - resultado del análisis del ganglio centinela negativo mediante RT-PCR, positivo en el análisis histopatológico- (Gráfico 9).

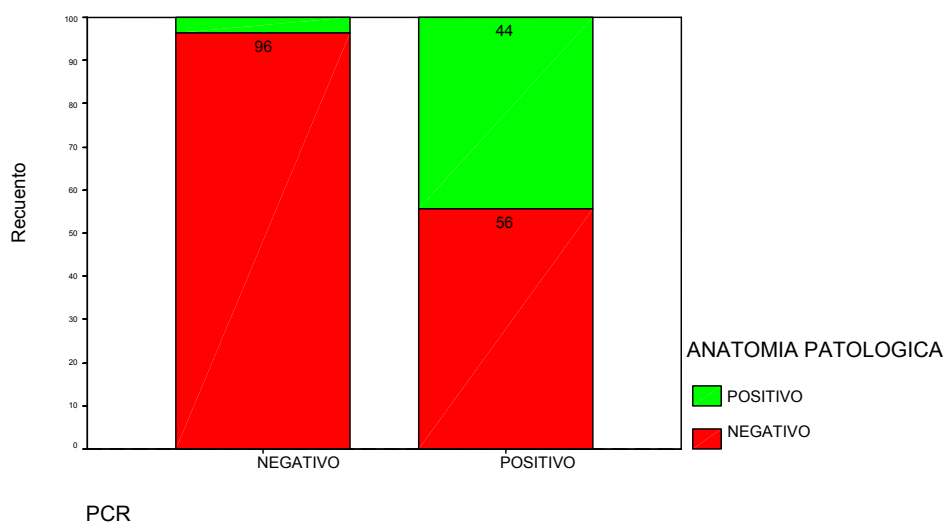


Gráfico 9: Histograma comparativo del resultado molecular del análisis del GC vs el resultado anatomopatológico en la serie global (%).

Cuando comparamos los tumores infiltrantes y los intraductales y microinfiltrantes, vemos que existen diferencias significativas en cuanto a la presencia de micrometástasis en los ganglios centinelas, al ser contrastados con las variables antes mencionadas.

Mediante análisis histopatológico rutinario, los tumores infiltrantes muestran afectación del centinela en un 19% de los casos y los intraductales y micropapilares en un 2%, $p < 7,4 \times 10^{-5}$ (Tabla 59, Gráfico 10).

Tabla 59: Análisis de la asociación entre el tipo histológico tumoral (infiltrante vs DCIS y microinvasivo) y la presencia de afectación del GC detectado mediante técnicas anatomopatológicas.

Tabla de contingencia

Recuento	ANATOMIA PATOLOGICA		Total
	0	1	
INFILTRANTE	560	135	695
INTRADUCTAL y MICROINVASIVO	85	2	87
Total	645	137	782

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	15,694 ^b	1	7,4E-05		
Corrección por continuidad ^a	14,531	1	,000		
Razón de verosimilitud	22,364	1	,000		
Estadístico exacto de Fisher				,000	,000
Asociación lineal por lineal					
N de casos válidos	782				

a. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b. 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 15,24.

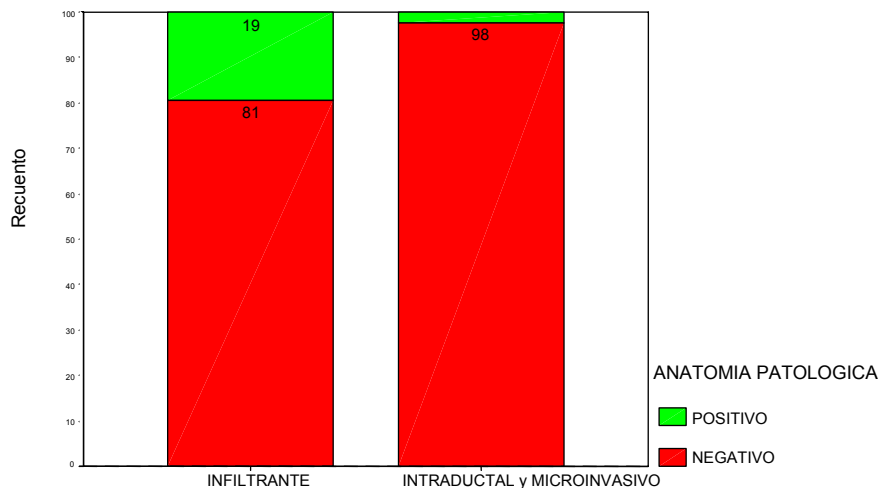


Gráfico 10: Histograma comparativo del resultado anatomopatológico del análisis del GC y el tipo histológico tumoral - infiltrante vs DCIS y microinvasivo - (%).

Mediante análisis molecular de los ganglios centinelas, los tumores infiltrantes muestran afectación del centinela en un 36% de los casos, y los intraductales y microinvasivos en un 18%, $p < 0,001$ (Tabla 60, Gráfico 11).

Tabla 60: Análisis de la asociación entre el tipo histológico tumoral (infiltrante vs DCIS y microinvasivo) y la presencia de afectación del GC detectado mediante técnicas moleculares.

Tabla de contingencia

Recuento	PCR		Total
	0	1	
INFILTRANTE	448	247	695
INTRADUCTAL y MICROINVASIVO	71	16	87
Total	519	263	782

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	10,187 ^b	1	,001		
Corrección por continuidad ^a	9,433	1	,002		
Razón de verosimilitud	11,162	1	,001		
Estadístico exacto de Fisher				,001	,001
Asociación lineal por lineal					
N de casos válidos	782				

a. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b. 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 29,26.

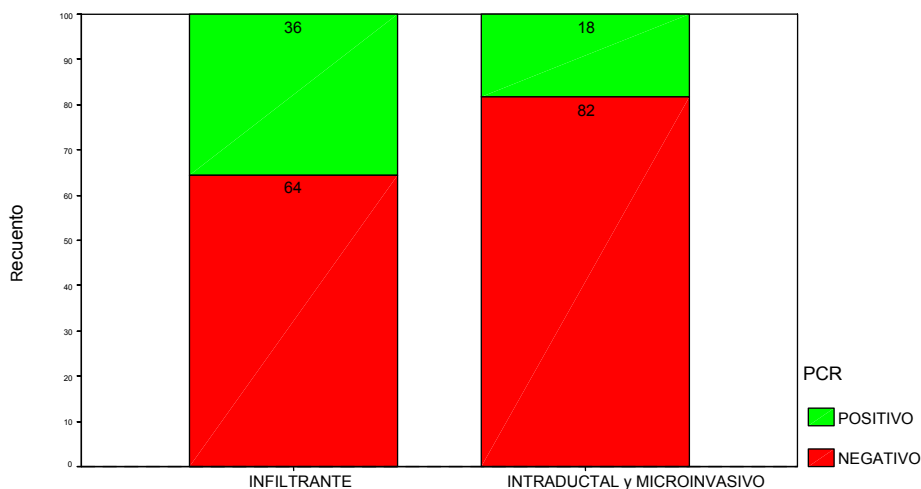


Gráfico 11: Histograma comparativo del resultado molecular del análisis del GC y el tipo histológico tumoral - infiltrante vs DCIS y microinvasivo - (%).

Mediante análisis rutinario y/o molecular, los tumores infiltrantes muestran afectación del centinela en un 38% de los casos y los intraductales y microinvasivos en un 18%, $p < 2,5E^{-04}$, (Tabla 61, Gráfico 12).

Tabla 61: Análisis de la asociación entre el tipo histológico tumoral (infiltrante vs DCIS y microinvasivo) y la presencia de afectación del GC detectado por técnicas anatomopatológicas y técnicas moleculares.

Tabla de contingencia

Recuento	EVALUACIÓN TOTAL		Total
	0	1	
INFILTRANTE	428	267	695
INTRADUCTAL y MICROINVASIVO	71	16	87
Total	499	283	782

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	13,429 ^b	1	2,5E-04		
Corrección por continuidad ^a	12,575	1	,000		
Razón de verosimilitud	14,755	1	,000		
Estadístico exacto de Fisher				,000	,000
Asociación lineal por lineal					
N de casos válidos	782				

a. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b. 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 31,48.

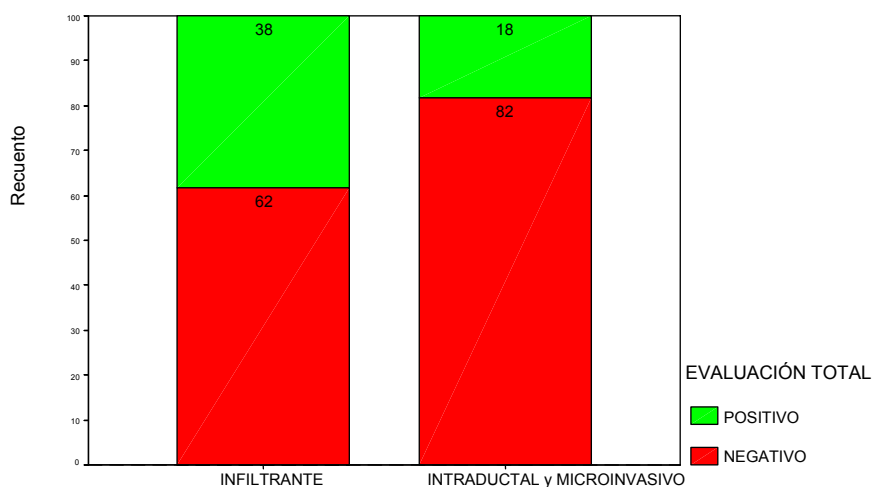


Gráfico 12: Histograma comparativo del resultado del análisis anatomopatológico y molecular del GC y el tipo histológico tumoral - infiltrante vs DCIS y microinvasivo - (%).

2. TUMORES INFILTRANTES

2.1. TIPOS DE CARCINOMAS INFILTRANTES Y AFECTACIÓN GANGLIONAR.

Cuando analizamos la serie de carcinomas infiltrantes, el 19,5% de los casos de carcinoma ductal, muestran afectación ganglionar mediante estudio anatomopatológico

rutinario frente al 36,2% de los casos mediante estudio molecular. El 34,5% de los casos de carcinoma lobulillar, muestran afectación ganglionar mediante estudio anatomopatológico rutinario frente al 41,4% de los casos mediante estudio molecular.

El 100% de los carcinomas tipo coloide y de tipo medular, no muestran afectación ganglionar cuando se realiza estudio anatomopatológico rutinario. El 11,8% y 50% de los casos resultan positivos respectivamente mediante estudio molecular (Tabla 62).

Tabla 62: Frecuencias y porcentajes de afectación del GC en la serie de tumores infiltrantes, según tipo histológico y método de detección empleado.

	ANATOMIA PATOLOGICA				PCR			
	NEGATIVO		POSITIVO		NEGATIVO		POSITIVO	
	Recuento	% fila	Recuento	% fila	Recuento	% fila	Recuento	% fila
COLOIDE	17	100,0			15	88,2	2	11,8
DUCTAL	512	80,5	124	19,5	406	63,8	230	36,2
LOBULILLAR	19	65,5	10	34,5	17	58,6	12	41,4
MEDULAR	4	100,0			2	50,0	2	50,0
MICROPAPILAR	2	66,7	1	33,3	2	66,7	1	33,3
TUBULAR	6	100,0			6	100,0		

Merece la pena destacar, que en el caso de los carcinomas lobulillares, los tumores de la variedad pleomórfica muestran un elevado porcentaje de positividad ganglionar (80%), independientemente de la técnica de análisis utilizada para estudiar el ganglio centinela.

Mediante análisis anatomopatológico rutinario, el 80% de los carcinomas lobulillares pleomórficos presentan afectación ganglionar, frente al 25% de los lobulillares estándar, $p < 0,019$ (Tabla 63, Gráfico 13).

Tabla 63: Análisis de la asociación entre el tipo histológico de carcinoma infiltrante lobulillar y la presencia de afectación del GC detectado por técnicas anatomopatológicas.

Tabla de contingencia

Recuento		ANATOMIA PATOLOGICA		Total
		NEGATIVO	POSITIVO	
TIPO	lobulillar	18	6	24
	lobulillar pleomórfico	1	4	5
Total		19	10	29

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	5,541 ^b	1	,019		
Corrección por continuidad ^a	3,373	1	,066		
Razón de verosimilitud	5,367	1	,021		
Estadístico exacto de Fisher				,036	,036
Asociación lineal por lineal					
N de casos válidos	29				

a. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b. 2 casillas (50,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 1,72.

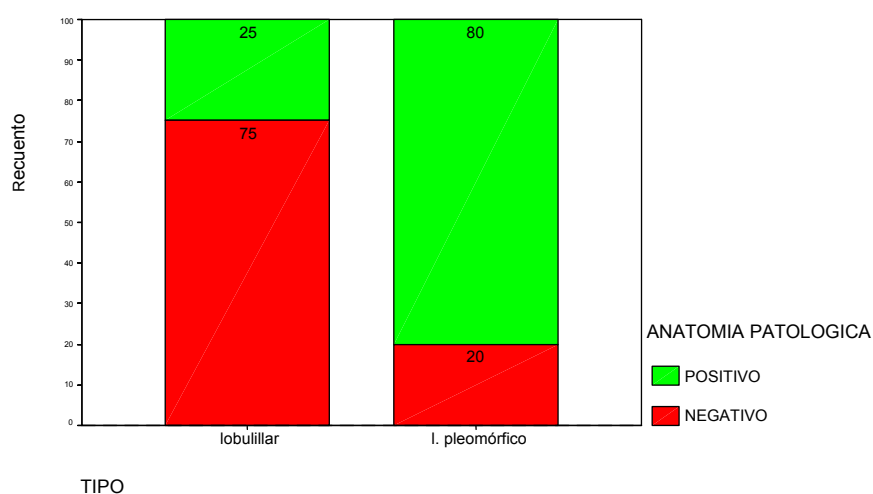


Gráfico 13: Histograma comparativo del resultado del análisis anatomopatológico del GC y el tipo histológico de carcinoma lobulillar infiltrante (%).

Mediante análisis molecular, el 80% de los carcinomas lobulillares pleomórficos presentan afectación ganglionar, frente al 33% de los lobulillares estándar (Tabla 64, Gráfico 14).

Tabla 64: Análisis de la asociación entre el tipo histológico de carcinoma infiltrante lobulillar y la presencia de afectación del GC detectado por técnicas moleculares.

Tabla de contingencia

Recuento		PCR		Total
		NEGATIVO	POSITIVO	
TIPO	lobulillar	16	8	24
	lobulillar pleomórfico	1	4	5
Total		17	12	29

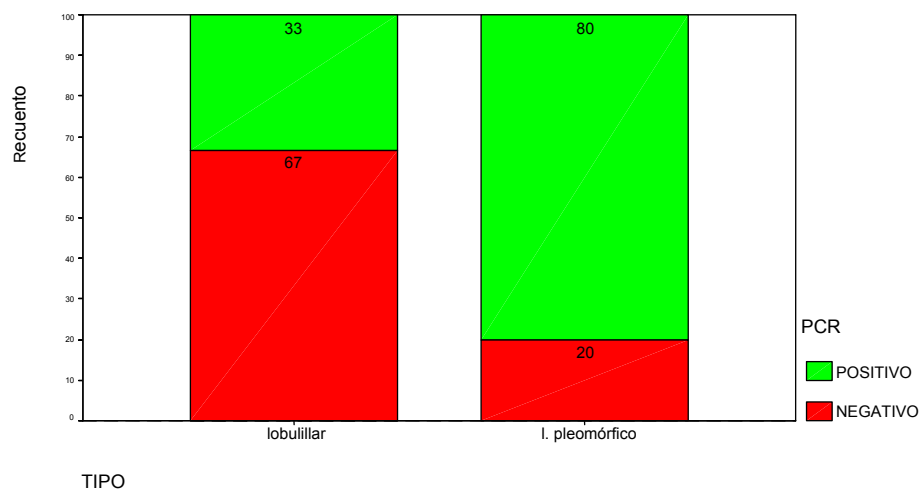


Gráfico 14: Histograma comparativo del resultado del análisis molecular del GC y el tipo histológico de carcinoma lobulillar infiltrante (%).

2.2. RELACIÓN TAMAÑO TUMORAL Y AFECTACIÓN GANGLIONAR.

Cuando analizamos la serie de carcinomas infiltrantes (ductales infiltrantes, lobulillar, tubular y coloide), los porcentajes de positividad de los ganglios centinela aumentan en relación al tamaño del tumor.

Al contrastar la variable AP con la estadificación tumoral, los tumores pT1a y pT1b, muestran el mismo porcentaje de ganglios centinela positivos, 11%, los tumores pT1c un 20%, los tumores pT2, un 29%, y los pT3 un 42%. Estas diferencias son significativas con un $p < 0,001$ (Tabla 65, Gráfica 15).

Tabla 65: Análisis de la asociación entre la estadificación tumoral (pT) y la presencia de afectación del GC detectado por técnicas anatomopatológicas.

Tabla de contingencia

Recuento	ANATOMIA PATOLOGICA		Total
	NEGATIVO	POSITIVO	
pT1a	16	2	18
pT1b	142	17	159
pT1c	311	76	387
pT2	84	35	119
pT3	7	5	12
Total	560	135	695

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	19,930 ^a	4	,001
Corrección por continuidad			
Razón de verosimilitud	19,760	4	,001
Asociación lineal por línea			
N de casos válidos	695		

a. 2 casillas (20,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 2,33.

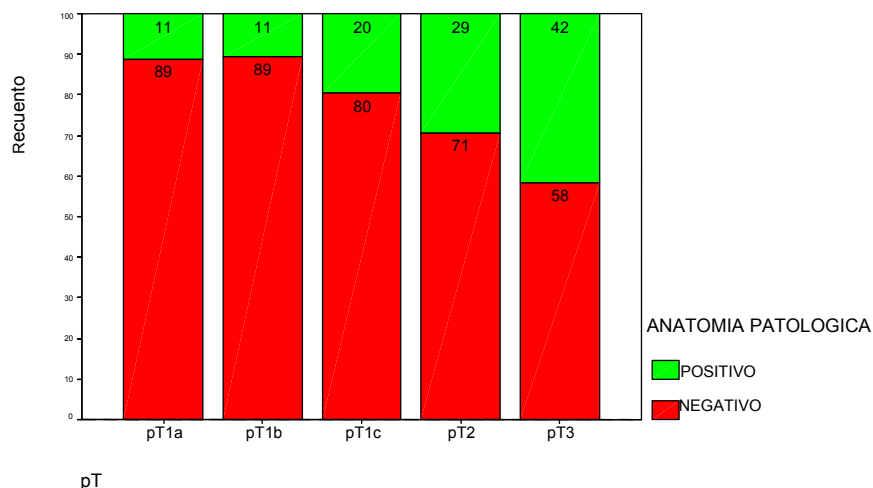


Gráfico 15: Histograma comparativo del resultado del análisis histopatológico del GC y la estadificación tumoral pT (%).

Al contrastar la variable PCR con la estadificación tumoral, los tumores pT1a muestran ganglios centinelas positivos en un 22% de los casos, los tumores pT1b 27%, los tumores pT1c un 38%, los pT2 un 39% y los pT3 un 58%. Estas diferencias son significativas con un $p < 0,030$, (Tabla 66, Gráfico 16).

Tabla 66: Análisis de la asociación entre la estadificación tumoral (pT) y la presencia de afectación del GC detectado por técnicas moleculares.

Tabla de contingencia

Recuento	PCR		Total
	NEGATIVO	POSITIVO	
pT1a	14	4	18
pT1b	116	43	159
pT1c	241	146	387
pT2	72	47	119
pT3	5	7	12
Total	448	247	695

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	10,745 ^a	4	,030
Corrección por continuidad			
Razón de verosimilitud	10,906	4	,028
Asociación lineal por línea			
N de casos válidos	695		

a. 1 casillas (10,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 4,26.

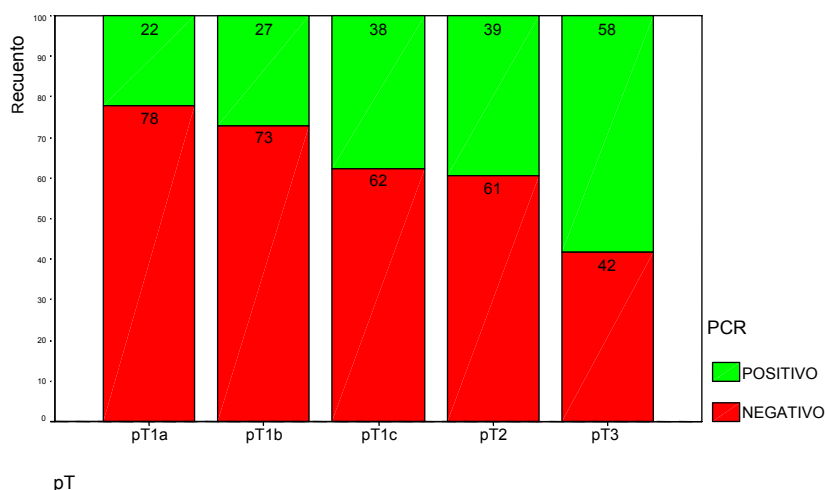


Gráfico 16: Histograma comparativo del resultado del análisis molecular del GC y la estadificación tumoral pT (%).

Al contrastar la variable ET, con la estadificación tumoral, los tumores pT1a muestran ganglios positivos en un 22% de los casos, los tumores pT1b 29%, los tumores pT1c un 40%, los pT2 un 46% y los pT3 un 67%. Estas diferencias son significativas con un $p < 0,004$ (Tabla 16, Gráfico 17).

Tabla 67: Análisis de la asociación entre la estadificación tumoral (pT) y la presencia de afectación del GC detectado por técnicas anatomopatológicas y moleculares.

Tabla de contingencia

Recuento	EVALUACIÓN TOTAL		Total
	0	1	
pT1a	14	4	18
pT1b	113	46	159
pT1c	233	154	387
pT2	64	55	119
pT3	4	8	12
Total	428	267	695

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	15,462 ^a	4	,004
Corrección por continuidad			
Razón de verosimilitud	15,661	4	,004
Asociación lineal por lineal			
N de casos válidos	695		

a. 1 casillas (10,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 4,61.

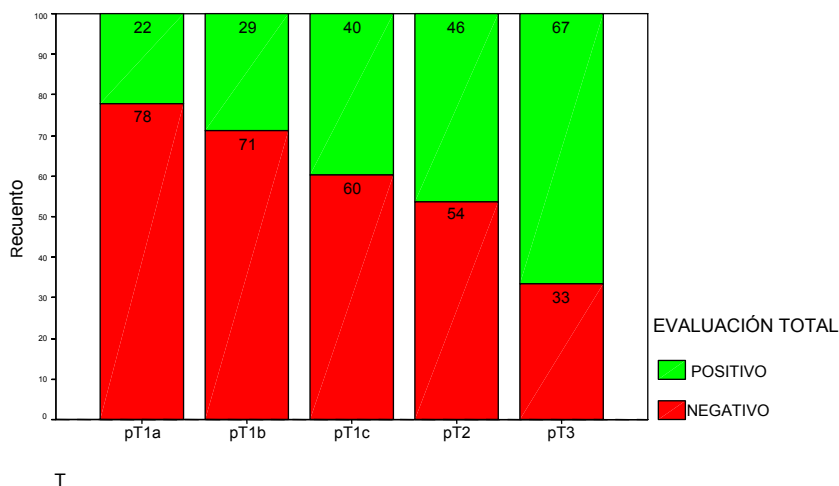


Gráfico 17: Histograma comparativo del resultado del análisis anatomopatológico y molecular del GC y la estadificación tumoral pT (%).

2.3. RELACIÓN GRADO TUMORAL Y AFECTACIÓN GANGLIONAR.

Estudiamos si el grado tumoral es una variable que condiciona el porcentaje de positividad detectado en los ganglios centinela. Al contrastar el grado tumoral con la variable AP, vemos una tendencia hacia un aumento de la positividad asociado al grado, pero que no alcanza la significación, $p < 0,123$. Los tumores de grado 1, tienen ganglios centinela positivo mediante técnicas histopatológicas, en un 16% de las ocasiones, los tumores de grado 2, en un 17%, y los tumores de grado 3, en un 23%.

Al comparar el grado tumoral con la variable PCR, también observamos la tendencia hacia un aumento de positividad a medida que aumenta el grado tumoral. Los tumores de grado 1, tienen un 26% de ganglios centinela positivos detectados mediante técnicas moleculares, los de grado 2, un 34%, y los de grado 3, un 41%. Esta tendencia no resulta significativa a nivel estadístico, $p < 0,053$.

Al contrastar la variable ET, frente al grado, las tendencias antes observadas de un aumento de positividad conforme se incrementa el grado tumoral se confirman. El 28% de los tumores de grado 1, tienen ganglios positivos detectados por técnicas histopatológicas y/o moleculares, el 36% de los tumores de grado 2, tienen ganglios positivos y el 45% de los

tumores de grado 3. Estas diferencias resultan estadísticamente significativas, $p < 0,018$ (Tabla 68, Gráfico 18).

Tabla 68: Análisis de la asociación entre el grado histológico y la presencia de afectación del GC detectado por técnicas anatomopatológicas y moleculares.

		EVALUACIÓN TOTAL		Total
		NEGATIVO	POSITIVO	
GRADO	1	42	16	58
	2	252	143	395
	3	116	96	212
Total		410	255	665

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	8,016 ^a	2	,018
Corrección por continuidad			
Razón de verosimilitud	8,074	2	,018
Asociación lineal por lineal	8,001	1	,005
N de casos válidos	667		

a. 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 22,26.

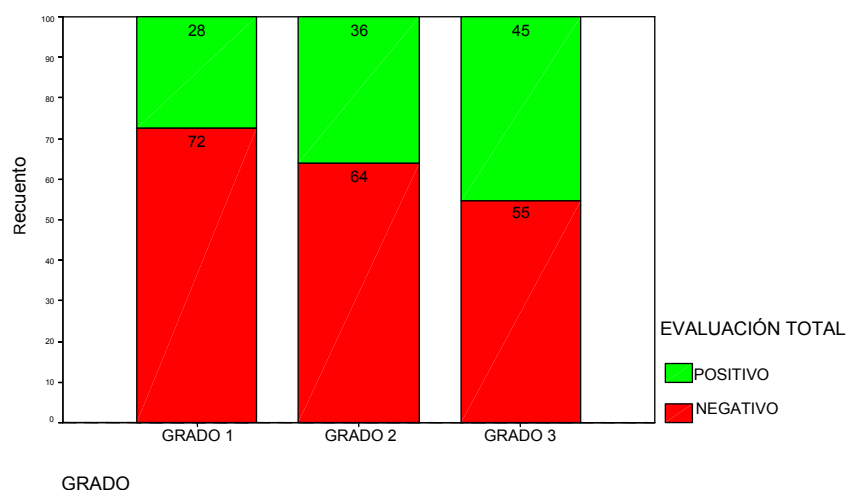


Gráfico 18: Histograma comparativo del resultado del análisis anatomopatológico y molecular del GC y el grado histológico (%).

Si analizamos la afectación ganglionar comparando tumores de grado 1 o 2 (agrupado), con tumores de grado 3, comprobamos que mediante el análisis por técnicas histopatológicas, los tumores de grado 1 o 2 muestran menor probabilidad de afectación (17%), frente a los tumores de grado 3 (23%) alcanzando la significación estadística $p < 0,042$ (Tabla 69, Gráfico 19).

Tabla 69: Análisis de la asociación entre el grado histológico (grado 1 y 2 agrupado vs 3) y la presencia de afectación del GC detectado mediante técnicas anatomopatológicas.

Tabla de contingencia

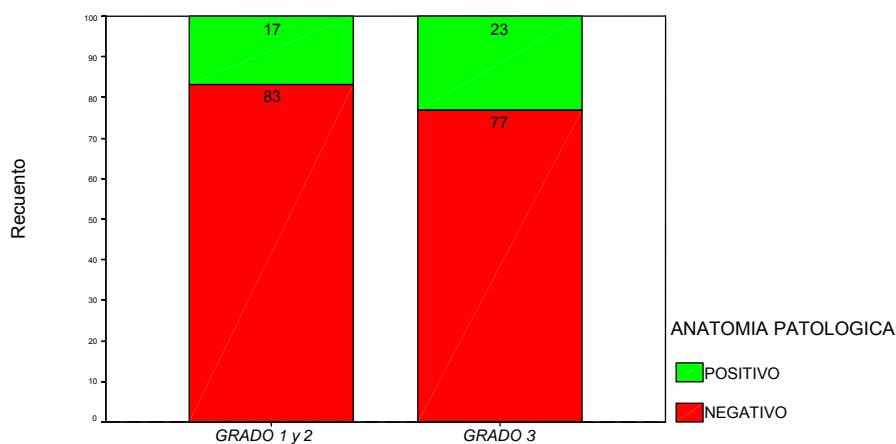
Recuento	ANATOMIA PATOLOGICA		Total
	NEGATIVO	POSITIVO	
GRADO 1 y 2	377	76	453
GRADO 3	164	50	214
Total	541	126	667

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	4,116 ^b	1	,042		
Corrección por continuidad ^a	3,698	1	,054		
Razón de verosimilitud	4,006	1	,045		
Estadístico exacto de Fisher				,045	,028
Asociación lineal por lineal	4,110	1	,043		
N de casos válidos	667				

a. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b. 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 40,43.



GRADO 1 y 2 vs 3

Gráfico 19: Histograma comparativo del resultado del análisis anatomopatológico del GC y el grado histológico - grado 1 y 2 agrupado vs 3 - (%).

Si analizamos la afectación ganglionar comparando tumores de grado 1 o 2 (agrupado), con tumores de grado 3, comprobamos que mediante el análisis por técnicas moleculares, los tumores de grado 1 o 2 muestran menor probabilidad de afectación (33%), frente a los tumores de grado 3 (41%). Estos valores alcanzan la significación estadística, $p < 0,033$ (Tabla 70, Gráfico 20).

Tabla 70: Análisis de la asociación entre el grado histológico (grado 1 y 2 agrupado vs 3) y la presencia de afectación del GC detectado mediante técnicas moleculares.

Tabla de contingencia

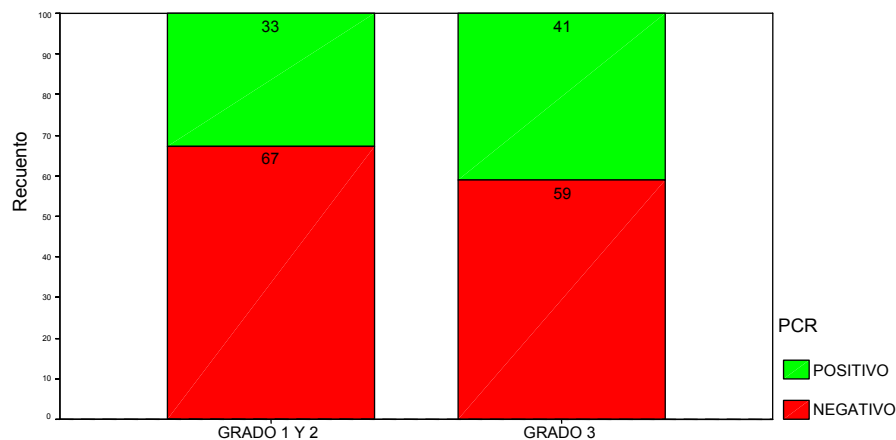
Recuento	PCR		Total
	NEGATIVO	POSITIVO	
GRADO 1 y 2	305	148	453
GRADO 3	126	88	214
Total	431	236	667

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	4,539 ^b	1	,033		
Corrección por continuidad ^a	4,177	1	,041		
Razón de verosimilitud	4,491	1	,034		
Estadístico exacto de Fisher				,037	,021
Asociación lineal por lineal	4,533	1	,033		
N de casos válidos	667				

a. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b. 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 75,72.



GRADO 1 y 2 vs 3

Gráfico 20: Histograma comparativo del resultado del análisis molecular del GC y el grado histológico – grado 1 y 2 agrupado vs 3 - (%).

Si analizamos la afectación ganglionar comparando tumores de grado 1 o 2 (agrupado), con tumores de grado 3, comprobamos que independientemente de la técnica empleada que los tumores de grado 1 o 2 muestran menor probabilidad de afectación (35%), frente a los tumores de grado 3 (45%). Estos valores alcanzan la significación estadística, $p < 0,011$ (Tabla 71, Gráfico 21).

Tabla 71: Análisis de la asociación entre el grado histológico (grado 1 y 2 agrupado vs 3) y la presencia de afectación del GC detectado mediante técnicas anatomopatológicas y moleculares.

Tabla de contingencia

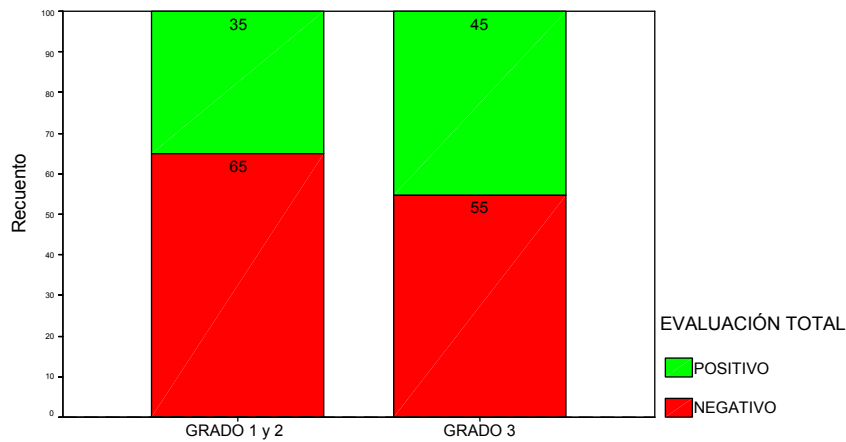
Recuento	EVALUACIÓN TOTAL		Total
	NEGATIVO	POSITIVO	
GRADO 1 y 2	294	159	453
GRADO 3	117	97	214
Total	411	256	667

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	6,429 ^b	1	,011		
Corrección por continuidad ^a	6,003	1	,014		
Razón de verosimilitud	6,371	1	,012		
Estadístico exacto de Fisher				,013	,007
Asociación lineal por lineal	6,419	1	,011		
N de casos válidos	667				

a. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b. 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 82,13.



GRADO 1 y 2 vs 3

Gráfico 21: Gráfico 22: Histograma comparativo del resultado del análisis anatomopatológico y molecular del GC y el grado histológico – grado 1 y 2 agrupado vs 3 - (%).

2.4. RELACIÓN PERMEACIÓN VASCULAR Y AFECTACIÓN GANGLIONAR.

Al estudiar la relación entre la presencia de permeación vascular en los tumores y la afectación de los ganglios centinela, todos los métodos empleados confirman que la presencia de permeación se asocia con un riesgo elevado de afectación ganglionar.

Mediante estudio anatomopatológico rutinario, el 54% de los tumores con presencia de permeación vascular muestran ganglios centinela positivos, $p < 2,6E^{-11}$ (Tabla 72, Gráfico 23).

Tabla 72: Análisis de la asociación entre la presencia de permeación vascular en el tumor primario y la afectación del GC detectado mediante técnicas anatomopatológicas.

Tabla de contingencia

Recuento		ANATOMIA PATOLOGICA		Total
		NEGATIVO	POSITIVO	
PERMEACIÓN VASCULAR	AUSENCIA	526	103	629
	PRESENCIA	25	29	54
Total		551	132	683

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	44,445 ^b	1	2,6E-11		
Corrección por continuidad ^a	42,083	1	,000		
Razón de verosimilitud	35,171	1	,000		
Estadístico exacto de Fisher				,000	,000
Asociación lineal por línea	44,380	1	,000		
N de casos válidos	683				

a. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b. 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 10,44.

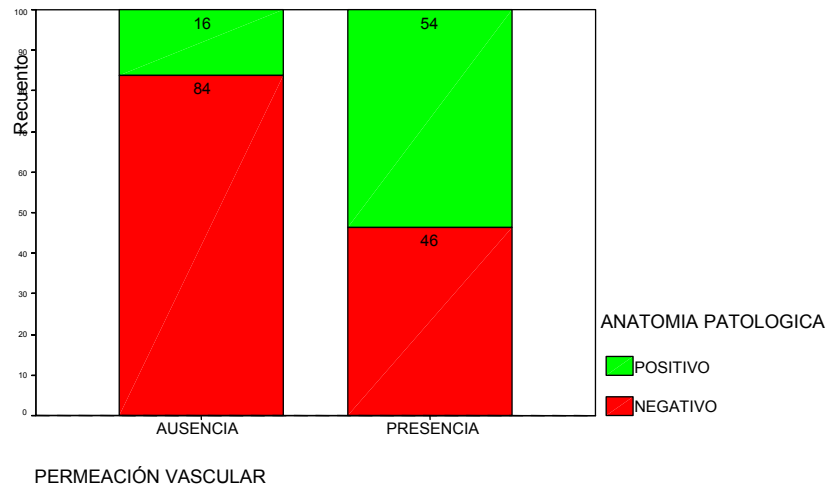


Gráfico 23: Histograma comparativo del resultado del análisis anatomopatológico del GC y la presencia de permeación vascular en el tumor primario (%).

Mediante técnicas moleculares, el 54% de los tumores con presencia de permeación vascular muestran ganglios centinela positivos, $p < 0,003$ (Tabla 73, Gráfico 24).

Tabla 73: Análisis de la asociación entre la presencia de permeación vascular en el tumor primario y la afectación del GC detectado mediante técnicas moleculares.

Tabla de contingencia

Recuento		PCR		Total
		NEGATIVO	POSITIVO	
PERMEACIÓN VASCULAR	AUSENCIA	416	213	629
	PRESENCIA	25	29	54
Total		441	242	683

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	8,557 ^b	1	,003		
Corrección por continuidad ^a	7,712	1	,005		
Razón de verosimilitud	8,169	1	,004		
Estadístico exacto de Fisher				,005	,003
Asociación lineal por línea	8,544	1	,003		
N de casos válidos	683				

a. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b. 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 19,13.

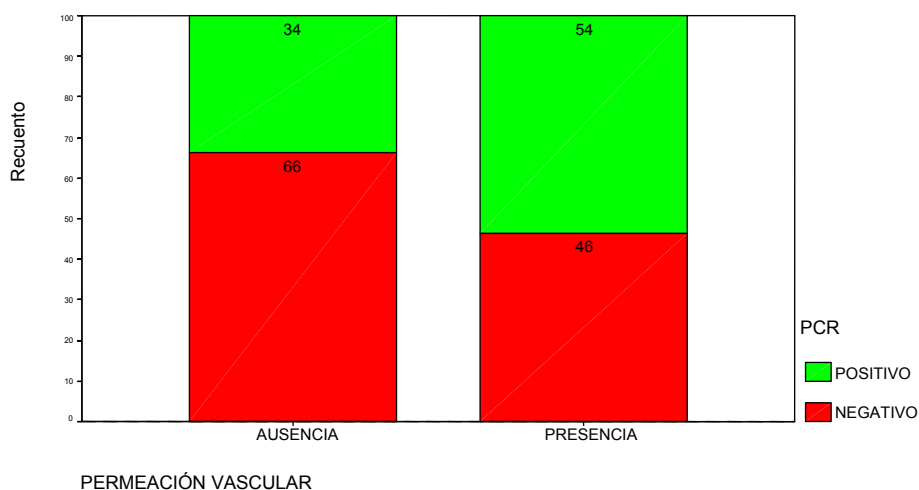


Gráfico 24: Histograma comparativo del resultado del análisis molecular del GC y la presencia de permeación vascular en el tumor primario (%).

Mediante análisis combinado, el 59% de los tumores con presencia de permeación vascular muestran afectación ganglionar, $p < 0,001$ (Tabla 74, Gráfico 25).

Tabla 74: Análisis de la asociación entre la presencia de permeación vascular en el tumor primario y la afectación del GC detectado mediante técnicas anatomopatológicas y moleculares.

Tabla de contingencia

Recuento		EVALUACIÓN TOTAL		Total
		NEGATIVO	POSITIVO	
PERMEACIÓN VASCULAR	AUSENCIA	399	230	629
	PRESENCIA	22	32	54
Total		421	262	683

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	10,831 ^b	1	,001		
Corrección por continuidad ^a	9,893	1	,002		
Razón de verosimilitud	10,476	1	,001		
Estadístico exacto de Fisher				,001	,001
Asociación lineal por línea	10,815	1	,001		
N de casos válidos	683				

a. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b. 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 20,71.

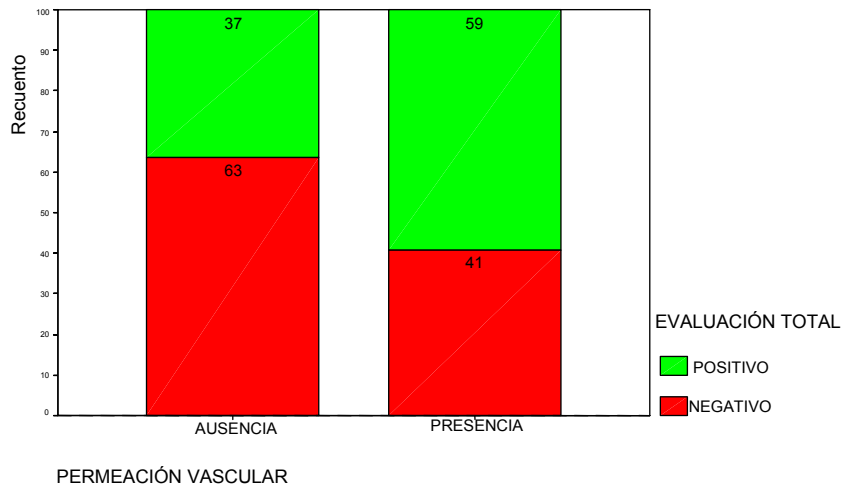


Gráfico 25: Histograma comparativo del resultado del análisis anatomopatológico y molecular del GC y la presencia de permeación vascular en el tumor primario (%).

2.5. RELACIÓN MULTICENTRICIDAD O BILATERALIDAD Y AFECTACIÓN GANGLIONAR.

La multicentricidad y la presencia de tumores contralaterales, en el momento del diagnóstico, no están relacionadas con la afectación ganglionar.

El 27% de los tumores multicéntricos frente al 19% de los tumores únicos, presentan afectación del ganglio centinela, detectado mediante técnicas anatomopatológicas de rutina ($p<0,204$). Si el análisis de los ganglios centinela se efectúa mediante técnicas moleculares, el 47% de los tumores multicéntricos muestran ganglios centinela afectados, frente al 35% ($p<0,107$). En el análisis combinado, el 47% de los tumores multicéntricos muestran ganglios centinela afectados, frente al 38% ($p<0,239$).

Al analizar los tumores que presentaban una mama contralateral afectada en el momento del diagnóstico inicial, en el estudio anatomopatológico rutinario, el 9% de los tumores contralaterales, presentan afectación ganglio centinela frente al 20% de los tumores sin afectación contralateral ($p<0,701$). Mediante estudio molecular, la tendencia anterior se invierte, y el 45% de los tumores con afectación contralateral muestran enfermedad residual en el ganglio centinela frente al 35% de los tumores no contralaterales ($p<0,533$). En el análisis combinado, el 45% de los tumores con afectación contralateral muestran afectación del ganglio centinela frente al 38% de los tumores no contralaterales ($p<0,757$).

2.6. RELACIÓN EXPRESIÓN DE RECEPTORES HORMONALES (ESTRÓGENOS Y PROGESTERONA), FACTOR DE PROLIFERACIÓN Y AFECTACIÓN GANGLIONAR.

La expresión de receptores hormonales en el tumor primario, detectada mediante inmunohistoquímica, no está relacionada con la afectación ganglionar.

El 22% de los tumores RE negativos muestran afectación ganglionar detectada mediante técnicas histopatológicas, frente al 19% de los tumores con RE positivos ($p < 0,587$). El 40% de los tumores RE negativos muestran afectación ganglionar detectada mediante técnicas moleculares, frente al 36% de los tumores con RE positivos ($p < 0,470$). El 42% de los receptores negativos muestran afectación ganglionar detectada mediante análisis combinado de las dos técnicas, frente al 39% de los RE positivos ($p < 0,676$).

El 20% de los tumores RP negativos muestran afectación ganglionar detectada mediante técnicas histopatológicas, al igual que el 20% de los tumores con RP positivos ($p < 0,822$). El 41% de los tumores RP negativos muestran afectación del ganglio centinela detectada mediante técnicas moleculares, frente al 35% de los tumores RP positivos ($p < 0,160$). El 43% de los tumores con RP negativos muestran afectación ganglionar detectada mediante análisis combinado de las dos técnicas, frente al 38% de los tumores RP positivos ($p < 0,215$).

Al estudiar la expresión del factor de proliferación nuclear, Ki67, ninguna de las variables muestra significación estadística. El 20% de los tumores Ki67 positivo presentan ganglios afectados mediante rutina histopatológica, frente al 18% de los negativos ($p < 0,722$). El 36% de los tumores Ki67 positivo presentan afectación ganglionar detectada mediante RT-PCR, frente al 35% de los tumores negativos ($p < 0,891$). El 40% de los tumores con Ki67 positivo presentan afectación del centinela detectado por cualquier técnica, frente el 38% de los tumores negativos ($p < 0,761$).

2.7. RELACIÓN SOBREEXPRESIÓN/AMPLIFICACIÓN HER2-neu Y AFECTACIÓN GANGLIONAR.

La sobreexpresión/amplificación del oncogén HER2/neu en el tumor primario, no está relacionado con la positividad del ganglio centinela. Mediante el estudio anatomopatológico rutinario, el 27% de los tumores con el HER2 sobreexpresado/amplificado muestran ganglios centinelas positivos frente al 17% de los HER2 negativos ($p < 0,086$). Mediante el estudio molecular, el 38% de los tumores con el HER2 sobreexpresado/amplificado muestran ganglios centinela positivos, frente el 35% de los HER2 negativo ($p < 0,710$). Mediante el estudio combinado, el 42% de los tumores con el HER2 sobreexpresado/amplificado muestran ganglios centinela positivos, frente el 38% de los HER2 negativo ($p < 0,576$).

2.8. RELACIÓN SOBREEXPRESIÓN/AMPLIFICACIÓN HER2-neu Y OTROS FACTORES PRONÓSTICOS.

Existe una relación estadísticamente significativa entre la sobreexpresión/amplificación del HER2 y el aumento en el grado histológico tumoral, la falta de expresión de los receptores hormonales, la elevada actividad proliferativa (expresión del factor de proliferación nuclear Ki67), y la presencia de permeación vascular.

El 100% de los tumores de grado 1, no poseen sobreexpresión/amplificación del HER2, mientras que el 4% de los tumores de grado 2 y el 21% de los tumores de grado 3, poseen amplificación del oncogén ($p < 1,71E-09$).

El 31% de los tumores con sobreexpresión/amplificación del HER2, no expresan RE frente al 9% de los tumores sin sobreexpresión/amplificación del HER2 ($p < 3,18E-06$). El 44% de los tumores con sobreexpresión/amplificación del HER2 no expresan RP frente al 21% de los tumores sin sobreexpresión/amplificación del HER2 ($P < 2,47E-04$).

El 36% de los tumores con sobreexpresión/amplificación del HER2 poseen sobreexpresión del Ki67 frente al 11% de los tumores con ausencia de sobreexpresión/amplificación del HER2 ($p < 1,68E-06$).

El 21% de los tumores con sobreexpresión/amplificación del HER2 muestran permeación vascular frente al 6% de los tumores sin sobreexpresión/amplificación del oncogen ($p < 0,002$).

La sobreexpresión/amplificación del HER2-neu en el grupo pN0 (pN0, pN0(mol+) y pN0(i+)), está relacionada positivamente con el grado histológico elevado, con la falta de expresión de los receptores hormonales y con elevada expresión de ki67.

En el grupo de los pN0, el 4% de los tumores de grado 2 y el 20% de los tumores de grado 3, poseen amplificación del oncogén, mientras que el 100% de los tumores de grado 1, no poseen sobreexpresión/amplificación del HER2, ($p < 6,39E-08$).

El 32% de los tumores con sobreexpresión/amplificación del HER2, no expresan el RE frente al 9% de los tumores sin sobreexpresión/amplificación ($p < 4,88E-06$). El 46% de los tumores con sobreexpresión/amplificación del HER2, no expresan el RP frente al 21% de los tumores sin sobreexpresión/amplificación ($p < 2,23E-04$).

El 33% de los tumores con el oncogen sobreexpresado/amplificado poseen sobreexpresión del Ki67 frente al 11% de los tumores sin sobreexpresión/amplificación del HER2 ($p < 1,75E-04$).

2.9. RELACIÓN CLASIFICACIÓN MOLECULAR Y AFECTACIÓN GANGLIONAR.

Si clasificamos los tumores como luminales, triple negativos o HER2 positivos, según los criterios mencionados previamente, no se demuestra relación entre la clasificación molecular y la afectación del ganglio centinela.

Mediante análisis anatomopatológico de rutina, presentan afectación del ganglio centinela, 17% de los tumores luminales, 23% de los tumores triples negativos y 27% de los HER2 positivos ($p < 0,157$). Mediante análisis molecular, presentan afectación del ganglio centinela, 34% de los tumores luminales, 45% de los triples negativos, y 38% de los HER2 positivos ($p < 0,364$). Mediante análisis combinado, presentan afectación del ganglio

centinela, 37% de los tumores luminales, 45% de los tumores triples negativos y 42% de los HER2 positivos $p < 0,538$.

2.10. RELACIÓN CLASIFICACIÓN RIESGO (St. GALLEN) Y AFECTACIÓN GANGLIONAR.

Al analizar los tumores infiltrantes clasificados según los criterios de St. Gallen, mencionados previamente, comprobamos la relación entre la clasificación del tumor primario en grupos de riesgo de recaída y aumento en el porcentaje de positividad del ganglio centinela.

Mediante estudio anatomopatológico rutinario, muestran afectación del ganglio centinela, 10% de los tumores de riesgo bajo, 19% de los tumores de riesgo medio y 25% de los tumores de riesgo elevado $p < 0,002$ (Tabla 75 y Gráfico 26).

Tabla 75: Análisis de la asociación entre la clasificación de riesgo de St. Gallen y la afectación del GC detectado mediante técnicas anatomopatológicas.

Tabla de contingencia

Recuento	ANATOMIA PATOLOGICA		Total
	NEGATIVO	POSITIVO	
RIESGO BAJO	111	12	123
RIESGO MEDIO	190	45	235
RIESGO ALTO	225	74	299
Total	526	131	657

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	12,415 ^a	2	,002
Corrección por continuidad			
Razón de verosimilitud	13,619	2	,001
Asociación lineal por lineal	12,081	1	,001
N de casos válidos	657		

a. 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 24,53.

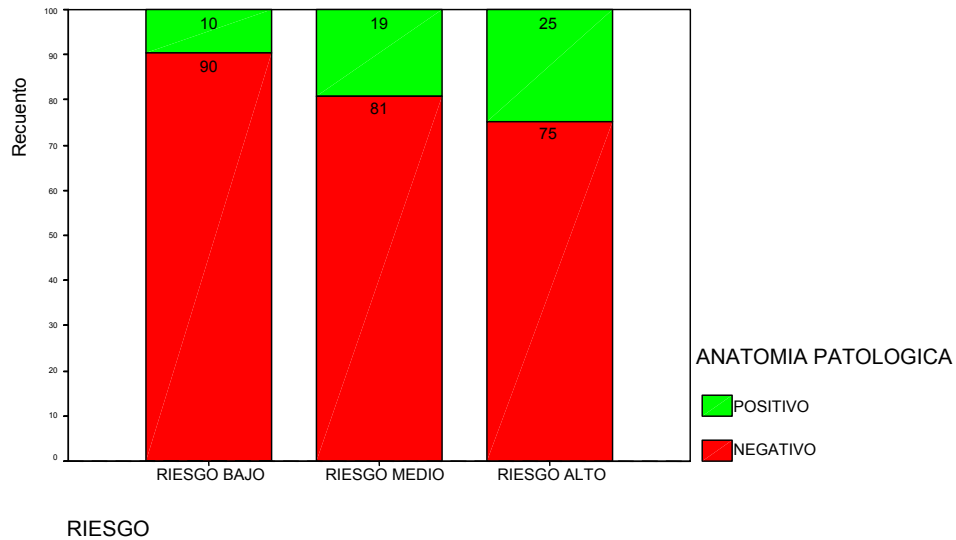


Gráfico 26: Histograma comparativo del resultado del análisis anatomopatológico del GC y la clasificación de riesgo de St. Gallen (%).

Mediante análisis molecular, muestran afectación del ganglio centinela, 25% de los tumores de riesgo bajo, 37% de los tumores de riesgo medio y 41% de los tumores de riesgo alto, $p < 0,010$ (Tabla 76, Gráfico 27).

Tabla 76: Análisis de la asociación entre la clasificación de riesgo de St. Gallen y la afectación del GC detectado mediante técnicas moleculares.

Tabla de contingencia

Recuento	PCR		Total
	NEGATIVO	POSITIVO	
RIESGO BAJO	92	31	123
RIESGO MEDIO	148	87	235
RIESGO ALTO	177	122	299
Total	417	240	657

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	9,185 ^a	2	,010
Corrección por continuidad			
Razón de verosimilitud	9,546	2	,008
Asociación lineal por lineal	8,195	1	,004
N de casos válidos	657		

a. 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 44,93.

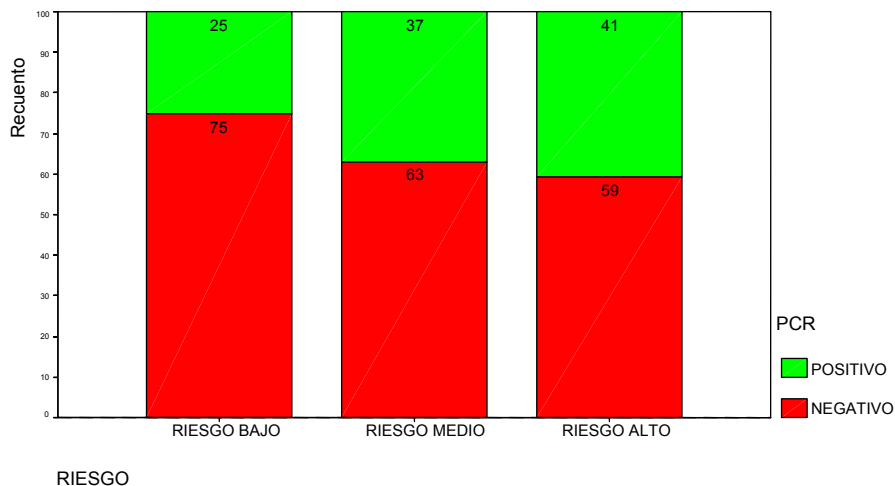


Gráfico 27: Histograma comparativo del resultado del análisis molecular del GC y la clasificación de riesgo de St. Gallen (%).

Mediante análisis combinado, muestran afectación del ganglio centinela, 27% de los tumores de riesgo bajo, 39% de los tumores de riesgo medio y 45% de los tumores de riesgo alto, $p < 0,002$ (Tabla 77, Gráfico 28).

Tabla 77: Análisis de la asociación entre la clasificación de riesgo de St. Gallen y la afectación del GC detectado mediante técnicas anatomopatológicas y moleculares.

Tabla de contingencia

Recuento	EVALUACIÓN TOTAL		Total
	NEGATIVO	POSITIVO	
RIESGO BAJO	90	33	123
RIESGO MEDIO	143	92	235
RIESGO ALTO	164	135	299
Total	397	260	657

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	12,261 ^a	2	,002
Corrección por continuidad			
Razón de verosimilitud	12,647	2	,002
Asociación lineal por línea	11,657	1	,001
N de casos válidos	657		

a. 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 48,68.

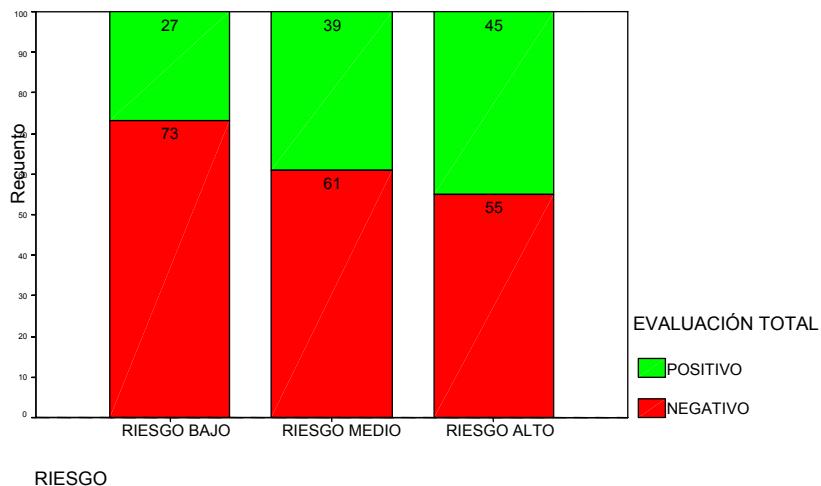


Gráfico 28: Histograma comparativo del resultado del análisis anatomopatológico y molecular del GC y la clasificación de riesgo de St. Gallen (%).

A continuación mostramos una tabla resumen de las características clínico-patológicas de los tumores infiltrantes según el resultado del análisis del ganglio centinela empleando el análisis molecular, el análisis anatomopatológico y la combinación de ambas (Tabla 78).

Tabla 78: Resumen de las principales características clínico-patológicas de la serie de tumores infiltrantes en función de la detección de afectación ganglionar según los distintos métodos empleados.

	RT-PCR		APA		EVALUACIÓN TOTAL		p
	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	
Nº PACIENTES	448	247	560	135	428	267	
TAMAÑO TUMORAL (mm)	14,16±6,04	16,40±8,67	14,31±6,60	17,62±8,64	13,96±5,97	16,55±8,52	
GRADO HISTOLÓGICO							
I-II	305 (67%)	148 (33%)	377 (83%)	76 (17%)	294 (65%)	159 (35%)	
III	126 (59%)	88 (41%)	164 (77%)	50 (23%)	117 (55%)	97 (45%)	p<0,011
PERMEACIÓN VASCULAR							
AUSENCIA	416 (66%)	213 (34%)	526 (84%)	103 (16%)	399 (63%)	230 (37%)	
PRESENCIA	25 (46%)	29 (54%)	25 (46%)	29 (54%)	22 (41%)	32 (59%)	p<2,6E-11
MULTICENTRICIDAD							
NO	424 (65%)	226 (35%)	527 (81%)	123 (19%)	404 (62%)	246 (38%)	
SI	24 (53%)	21 (47%)	33 (73%)	12 (27%)	24 (53%)	21 (47%)	p<0,239
BILATERALIDAD							
NO	442 (65%)	242 (35%)	550 (80%)	134 (20%)	422 (62%)	262 (38%)	
SI	6 (55%)	5 (45%)	10 (91%)	1 (9%)	6 (55%)	5 (45%)	p<0,757
RECEPTOR ESTRÓGENOS							
NEGATIVO	46 (60%)	31 (40%)	60 (78%)	17 (22%)	45 (58%)	32 (42%)	
POSITIVO	378 (64%)	213 (36%)	476 (81%)	115 (19%)	360 (61%)	231 (39%)	p<0,676
RECEPTOR PROGESTERONA							
NEGATIVO	99 (59%)	68 (41%)	133 (80%)	34 (20%)	95 (57%)	72 (43%)	
POSITIVO	324 (65%)	172 (35%)	399 (80%)	97 (20%)	309 (62%)	187 (38%)	p<0,215
FACTOR DE PROLIFERACIÓN- Ki67							
NEGATIVO	326 (65%)	177 (35%)	411 (82%)	92 (18%)	311 (62%)	192 (38%)	
POSITIVO	48 (64%)	27 (36%)	60 (80%)	15 (20%)	45 (60%)	30 (40%)	p<0,761
HER2-neu							
NEGATIVO	309 (65%)	165 (35%)	393 (83%)	81 (17%)	296 (62%)	178 (38%)	
POSITIVO	30 (62%)	18 (38%)	35 (73%)	13 (27%)	28 (58%)	20 (42%)	p<0,576
CLASIFICACIÓN MOLECULAR							
LUMINAL	284 (66%)	147 (34%)	359 (83%)	72 (17%)	271 (63%)	160 (37%)	
TRIPLE NEGATIVO	22 (55%)	18 (45%)	31 (78%)	9 (23%)	22 (55%)	18 (45%)	
HER2-neu	30 (62%)	18 (38%)	35 (73%)	13 (27%)	28 (58%)	18 (42%)	p<0,538
CLASIFICACIÓN RIESGO St. GALEN							
I	92 (75%)	31 (25%)	111 (90%)	12 (10%)	90 (73%)	33 (27%)	
II	148 (63%)	87 (37%)	190 (81%)	45 (19%)	143 (61%)	92 (39%)	
III	177 (59%)	122 (41%)	225 (75%)	74 (25%)	164 (55%)	135 (45%)	p<0,002

2.11. RELACIÓN CLASIFICACIÓN RIESGO (St. GALLEN) Y ESTADIFICACIÓN GANGLIONAR.

Al analizar los tumores infiltrantes clasificados según los criterios de St. Gallen, agrupado en dos grupos de riesgo, (bajo vs. medio y alto, para simplificar el análisis), comprobamos que la clasificación del tumor primario en grupos de riesgo de recaída condiciona la estadificación axilar.

En los tumores de riesgo bajo el 72,4% de los casos son pN0(sn). El 17,9% de los casos son pN0(mol+)(sn). El 1,5% son pN0(i+)(sn). El 4,1% de los casos son pN1mi(sn). El 4,1 % de los casos son pN1a(sn).

En los tumores de riesgo medio y alto el 57,1% de los casos son pN0(sn). El 21% de los casos son pN0(mol+)(sn). El 6,9% son pN0(i+)(sn). El 5,4% de los casos son pN1mi(sn). El 9,6 % de los casos son pN1a(sn), $p < 0,011$ (Tabla 79, Grafico 29).

Tabla 79: Análisis de la asociación entre la clasificación de riesgo de St. Gallen (Riesgo medio y alto agrupado) y la estadificación axilar (pN).

Tabla de contingencia

Recuento	pN					Total
	pN0	pN0 (mol+)	pN0 (i+)	pN1mi	pN1a	
RIESGO BAJO	89	22	2	5	5	123
RIESGO MEDIO Y ALTO	305	112	37	29	51	534
Total	394	134	39	34	56	657

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	12,965 ^a	4	,011
Corrección por continuidad			
Razón de verosimilitud	15,017	4	,005
Asociación lineal por línea	9,847	1	,002
N de casos válidos	657		

a. 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 6,37.

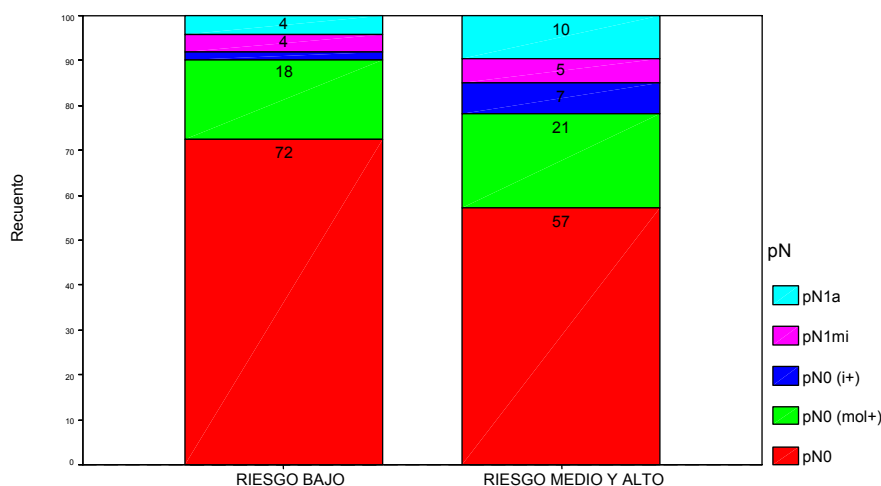


Gráfico 29: Histograma comparativo de la clasificación de riesgo de St. Gallen (riesgo medio y alto agrupado) y la estadificación axilar- pN -(%).

2.12. RELACIÓN PERMEACIÓN VASCULAR Y ESTADIFICACIÓN GANGLIONAR.

Al estudiar la relación entre la presencia de permeación vascular en los tumores y la estadificación ganglionar, comprobamos que la presencia de permeación vascular en el tumor primario condiciona la estadificación axilar. Se observa presencia de permeación vascular en el tumor primario en el 5,3% de los pN0(sn), en el 2,2% de los pN0(mol+)(sn), en 17,9% de los pN0(i+), en el 20% de los pN1mi y en el 27,3% de los pN1a, $p < 2,4 \times 10^{-10}$ (Tabla 80, Gráfica 30).

Tabla 80: Análisis de la asociación entre la presencia de permeación vascular en el tumor primario y la estadificación axilar (pN).

Tabla de contingencia

Recuento		pN					Total
		pN0	pN0 (mol+)	pN0 (i+)	pN1mi	pN1a	
PERMEACIÓN VASCULAR	AUSENCIA	396	133	32	28	40	629
	PRESENCIA	22	3	7	7	15	54
Total		418	136	39	35	55	683

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	50,843 ^a	4	2,4E-10
Corrección por continuidad			
Razón de verosimilitud	40,280	4	,000
Asociación lineal por línea	39,625	1	,000
N de casos válidos	683		

a. 3 casillas (30,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 2,77.

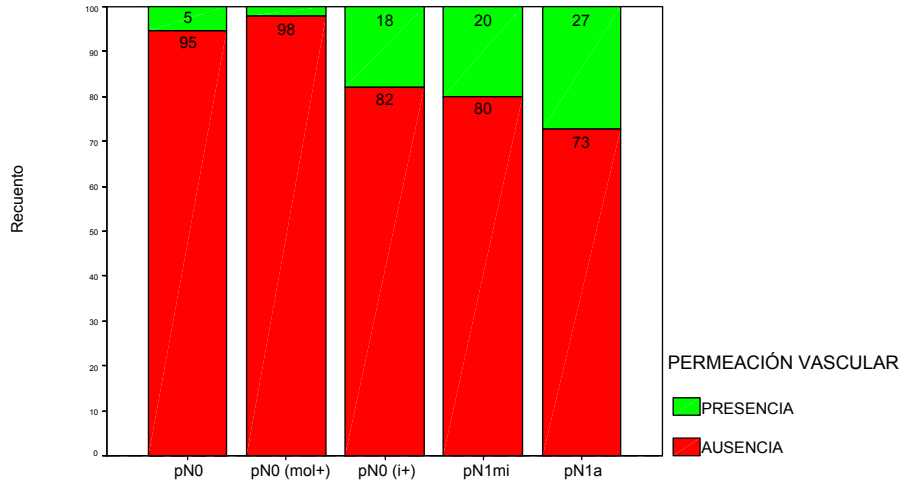


Gráfico 30: Histograma comparativo entre la presencia de permeación vascular en el tumor primario y la estadificación axilar- pN -(%).

2.13. ANÁLISIS MULTIVARIADO.

Se ha empleado el análisis de regresión logística binaria, para analizar si la detección de micrometástasis en los ganglios centinelas (determinado por diferentes técnicas) esta determinada por algunas de las características del tumor primario.

En la serie de carcinoma invasivo, se han contrastado los datos dicotómicos generados por las variables APA (análisis histopatológico), PCR (análisis molecular) y ET (análisis combinado de técnicas histopatológicas y análisis molecular) y se contrastaron con los cuatro parámetros significativos en los test de independencia: grado tumoral, tamaño tumoral, permeación vascular y riesgo de recidiva (Clasificación de St. Gallen).

Los dos parámetros que mantiene la significación en el análisis de regresión logística son: el riesgo de recidiva y la permeación vascular.

En la siguiente tabla (Tabla 81), mostramos el análisis multivariado de la detección de micrometástasis mediante técnicas histopatológicas teniendo en cuenta la clasificación de riesgo de St. Gallen como variable categórica y la permeación vascular.

Tabla 81: Estudio multivariado mediante regresión logística de la presencia de afectación del GC detectada mediante técnicas anatomatopatológicas en función de la presencia de permeación vascular en el tumor primario y la clasificación de riesgo de St. Gallen.

Prueba de Hosmer y Lemeshow

Paso	Chi-cuadrado	gl	Sig.
1	1,036	2	,596

Tabla de contingencias para la prueba de Hosmer y Lemeshow

		ANATOMIA PATOLOGICA = 0		ANATOMIA PATOLOGICA = 1		Total
		Observado	Esperado	Observado	Esperado	
Paso 1	RIESGO BAJO	103	103,964	11	10,036	114
	RIESGO MEDIO	182	185,646	44	40,354	226
	RIESGO ALTO	207	202,390	45	49,610	252
	PRESENCIA PERMEACION VASCULAR	25	25,000	28	28,000	53

Variables en la ecuación

	B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	I.C. 95,0% para EXP(B)	
							Inferior	Superior
Paso 1			7,062	2	,029			
RIESGO			7,062	2	,029			
RIESGO(1)	,812	,361	5,060	1	,024	2,252	1,110	4,568
RIESGO(2)	,932	,352	7,021	1	,008	2,539	1,275	5,059
PERMEAVA(1)	1,591	,304	27,368	1	,000	4,908	2,704	8,908
Constante	-2,338	,320	53,385	1	,000	,097		

a. Variable(s) introducida(s) en el paso 1: PERMEAVA.

Detección de micrometástasis mediante técnicas moleculares teniendo en cuenta la clasificación de riesgo de St. Gallen como variable categórica y la permeación vascular (Tabla 82).

Tabla 82: Estudio multivariado mediante regresión logística de la presencia de afectación del GC detectada mediante técnicas moleculares en función de la presencia de permeación vascular en el tumor primario y la clasificación de riesgo de St. Gallen.

Prueba de Hosmer y Lemeshow

Paso	Chi-cuadrado	gl	Sig.
1	,300	3	,960

Tabla de contingencias para la prueba de Hosmer y Lemeshow

		PCR = PCR NEGATIVO		PCR = PCR POSITIVO		Total
		Observado	Esperado	Observado	Esperado	
Paso 1	RIESGO BAJO	86	86,138	28	27,862	114
	RIESGO MEDIO	141	143,679	85	82,321	226
	RIESGO BAJO CON PERMEACIÓN	2	1,862	1	1,138	3
	RIESGO ALTO	158	155,183	94	96,817	252
	RIESGO MEDIO Y ALTO CON PERMEACIÓN	23	23,138	27	26,862	50

Variables en la ecuación

	B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	I.C. 95,0% para EXP(B)	
							Inferior	Superior
Paso 1			7,238	2	,027			
RIESGO			7,238	2	,027			
RIESGO(1)	,572	,254	5,085	1	,024	1,771	1,078	2,912
RIESGO(2)	,657	,248	7,028	1	,008	1,929	1,187	3,135
PERMEAVA(1)	,636	,294	4,671	1	,031	1,890	1,061	3,365
Constante	-1,129	,215	27,664	1	,000	,323		

a. Variable(s) introducida(s) en el paso 1: PERMEAVA.

Detección de micrometástasis mediante técnicas histopatológicas y moleculares teniendo en cuenta la clasificación de riesgo de St. Gallen como variable categórica y la permeación vascular (Tabla 83).

Tabla 83: Estudio multivariado mediante regresión logística de la presencia de afectación del GC detectada mediante técnicas anatomopatológica y moleculares en función de la presencia de permeación vascular en el tumor primario y la clasificación de riesgo de St. Gallen.

Prueba de Hosmer y Lemeshow

Paso	Chi-cuadrado	gl	Sig.
1	,450	3	,930

Tabla de contingencias para la prueba de Hosmer y Lemeshow

		EVALUACIÓN TOTAL = 0		EVALUACIÓN TOTAL = 1		Total
		Observado	Esperado	Observado	Esperado	
Paso 1	RIESGO BAJO	84	84,257	30	29,743	114
	RIESGO MEDIO	136	139,048	90	86,952	226
	RIESGO BAJO CON PERMEACION	2	1,743	1	1,257	3
	RIESGO ALTO	148	144,695	104	107,305	252
	RIESGO MEDIO Y ALTO CON PERMEACION	20	20,257	30	29,743	50

Variables en la ecuación

	B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	I.C. 95,0% para EXP(B)	
							Inferior	Superior
Paso 1								
RIESGO			9,348	2	,009			
RIESGO(1)	,572	,249	5,275	1	,022	1,771	1,087	2,886
RIESGO(2)	,742	,243	9,338	1	,002	2,101	1,305	3,382
PERMEAVA(1)	,714	,297	5,766	1	,016	2,042	1,140	3,658
Constante	-1,041	,210	24,576	1	,000	,353		

a. Variable(s) introducida(s) en el paso 1: PERMEAVA.

3. TUMORES INTRADUCTALES Y MICROINVASIVOS

Al analizar la serie de los carcinomas intraductales, detectamos en el conjunto de 73 tumores analizados, un 13,7% de ganglios centinelas clasificados como pN0(mol+).

Al contrastar las características tumorales disponibles con el resultado molecular del ganglio centinela, no encontramos correlaciones estadísticamente significativas.

No existen diferencias entre el porcentaje de positividad de los ganglios en relación a carcinoma intraductales de alto y bajo grado (14 y 13%).

Tampoco cuando contrastamos la expresión de receptores hormonales (29 muestras). El 11% de los tumores con RE negativos, muestran ganglios positivos frente al 15% de los tumores que son RE positivos. En el caso del RP, el 21% de los tumores sin expresión del RP, muestran positividad frente al 7% de los tumores con RP positivo.

Al analizar la serie de tumores microinvasivos (14 tumores), con las características tumorales disponibles, no encontramos relaciones significativamente estadísticas entre dichas características y el estado del ganglio centinela. El 25% de los tumores de grado 3, muestran ganglios afectados mediante el análisis histopatológico, este porcentaje sube al 50%, en el caso de los ganglios centinela analizado mediante técnicas moleculares.

En el caso del estudio de la relación con los receptores hormonales, el 20% de los casos con RE positivos presentan ganglios centinela afectados, cuando se evalúan mediante técnicas patológicas. Cuando se utilizan técnicas moleculares, el 67% de los tumores sin expresión de RE muestran afectación del centinela frente al 40% de los tumores que si expresan RE. El reducido número de casos, no permiten extraer conclusiones al respecto.

Cuando analizamos la expresión del RP, el 13% de los tumores sin expresión del RP, muestran metástasis en el ganglio centinela, detectado por técnicas histopatológicas, frente al 20% de los tumores con expresión del RP. Al utilizar técnicas moleculares, el porcentaje de

tumores sin expresión de RP, que muestran afectación del centinela es del 63%, frente al 20% de los tumores con expresión de RP, que muestran afectación ganglionar.

Al estudiar el riesgo de recidiva del tumor primario, en función de la expresión de los receptores hormonales y el grado, el 22,2% de los tumores de riesgo elevado presentan ganglios centinelas con afectación histológica.

En el análisis molecular de los ganglios centinela de tumores microinfiltrantes, el 55,6% de los tumores con riesgo elevado de recidiva, muestran afectación ganglionar.

Si analizamos como se distribuyen las muestras en función de la estadificación axilar y el riesgo de recidiva, vemos que el 100 % de los casos clasificados como pN0(mol+) y pN1a son de riesgo elevado frente a un 57% de los casos clasificados como pN0.

4. ESTUDIO COSTO- EFICACIA

Se ha realizado el estudio de costo-eficacia (CEA) de las técnicas de la inmunohistoquímica y la RT-PCR. Para ello se ha tenido en cuenta el coste del material empleado y el porcentaje de detección de ambas técnicas, expresándolo como cociente entre el coste de la técnica y la eficacia en la detección de micrometástasis.

El coste en la evaluación de un caso es de 30,05€ para la técnica de inmunohistoquímica, y de 20,63 € para la RT-PCR. El incremento en la detección de la inmunohistoquímica fue del 5,6%, mientras que el incremento de detección de la RT-PCR fue de 19,9%. Dichos datos quedan recogidos en la siguiente tabla (Tabla 84).

Tabla 84: Estudio costo eficacia de las técnicas de IHQ y RT-PCR.

Técnica	Coste (€)	Detección (%)	CEA
IHQ	30,05	5,6	5,36
RT-PCR	20,63	19,9	1,03

La RT-PCR es la técnica que tiene una relación coste eficacia más baja, debido a su menor coste y su mayor eficacia detectora.








Si analizamos la ocupación temporal que generan ambas técnicas. La técnica inmunohistoquímica conlleva una serie de pasos que se inician con la fijación del tejido y concluye con el montaje de la laminilla una vez revelada, el proceso global dura unas 40,7h. La siguiente tabla recoge los diferentes procesos con la duración de cada uno de ellos (Tabla 85).

Tabla 85: Etapas y duración de la técnica IHQ.

PASO	PROCESO	DURACIÓN (h)
1	FIJACIÓN	24
2	INCLUSIÓN PARAFINA	8
3	CORTE SECCIONES	2
4	MONTAJE SECCIÓN Y H&E	1
5	DESPARAFINACIÓN	1,30
6	PRETRATAMIENTO	0,20
7	INCUBACIÓN ANTICUERPOS	2
8	REVELADO Y TINCIÓN	1
9	MONTAJE SECCIONES	1
10	INTERPRETACIÓN	0,20
TOTAL		40,7

La técnica de la RT-PCR conlleva una serie de pasos que se inician con la congelación o procesamiento inmediato de la muestra y concluye una vez analizados los niveles de expresión, el proceso global dura unas 6,6h. La siguiente tabla recoge los diferentes procesos con la duración de cada uno de ellos (Tabla 86).

Tabla 86: Etapas y duración de la técnica RT-PCR.

PASO	PROCESO	DURACIÓN (h)
1	 CONGELACIÓN MUESTRA	0,10
2	 HOMOGENIZACIÓN TEJIDOS	1
3	 EXTRACCIÓN RNA	1
4	 CUANTIFICACIÓN ESPECTOFOTÓMETRO	1
5	 REACCIÓN RETROTRANSCRIPCIÓN	1,30
6	 REACCIÓN <i>REAL-TIME</i>	2
7	 INTERPRETACIÓN	0,20
TOTAL		6,6

Si comparamos las dos técnicas a través de una escala temporal, la técnica de la RT-PCR, supone una sexta parte de la duración de la técnica inmunohistoquímica.

DISCUSIÓN

VI. DISCUSIÓN

La mayor fuente de información pronóstica en cáncer de mama, proviene de la estadificación clínico-patológica. El estado de los ganglios linfáticos axilares es el factor de mayor valor pronóstico y junto con el tamaño suministra información sobre la estadificación.

Una cuarta parte de los pacientes diagnosticados como ganglios negativos presentan enfermedad metastásica a los 5-10 años del diagnóstico inicial. Se cree que las recaídas, en parte podrían ser el resultado de la difusión de metástasis no detectadas en el diagnóstico convencional inicial.

Numerosos estudios de carácter retrospectivo han puesto de relevancia que la detección de metástasis en ganglios linfáticos que pasaron desapercibidas durante el examen patológico estándar, identifican a pacientes con peor supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global. Por lo tanto uno de los objetivos ha sido desarrollar técnicas que incrementen la sensibilidad de detección.

La técnica del ganglio centinela permite evaluar el estado de la axila centrando el estudio en uno o pocos ganglios. Reduciendo así la morbilidad asociada a las linfadenectomías y permitiendo concentrar los recursos técnicos y económicos, al realizar el diagnóstico sobre un volumen tisular menor. En el Instituto John Wayne Cancer demostraron un incremento en la detección de metástasis del 13%, al comparar su tasa de detección (realizada sobre ganglio centinela) con series de pacientes con características tumorales similares sobre las que se había realizado linfadenectomía. Comprobaron de esta forma que el examen de volúmenes tisulares mucho mayores disminuía la eficacia en la detección de metástasis (Giuliano et al., 1995).

El tratamiento quirúrgico de las pacientes con cáncer de mama ha evolucionado hacia la conservación del órgano. En la actualidad, se realizan menos mastectomías que han sido reemplazadas por tumorectomías y radioterapia, como tratamiento estándar con un buen control local sin influencia sobre la supervivencia global.

La linfadenectomía permitía obtener información sobre el estado axilar y control de la enfermedad a nivel local, pero sin efecto directo sobre la supervivencia global. La información que suministraba es en la actualidad ofrecida por la técnica del GC, alternativa eficaz y sensible con menor morbilidad asociada. Se ha estimado que el porcentaje de falsos negativos asociados a la técnica ronda el 5% (Theodore Kim, 2006), al ser la tasa de recidivas locales muy baja – entre el 0,3 y el 0,12% - se acepta la no aplicación de la linfadenectomía en pacientes con GC negativo (Park et al., 2007). En los casos de GC positivo (macrometástasis), varios estudios han demostrado que entre el 48 – 87% de las pacientes poseen otros ganglios axilares afectados, por lo que la práctica habitual consiste en realizar la linfadenectomía como control loco-regional (Chu et al., 1999; Menes et al., 2005; Reynolds et al., 1999; van Deurzen et al., 2007; Viale et al., 2005).

Los diferentes estudios publicados muestran que las tasas de recidivas locales son bajas (Tabla 87), por lo que se empieza acuestionar el beneficio de la linfadenectomía, al menos en grupos de pacientes con características tumorales favorables.

Tabla 87: Estudios sobre tasas de recaídas locales en pacientes con GC positivo y sin linfadenectomía.

Autor y Año	N	SEGUIMIENTO MEDIO (meses)	RECIDIVAS (%)	TAMAÑO DE LA METÁSTASIS
Guenther et al., 2003	46	32	0	Micrometástasis en su mayoría
Fan et al., 2005	38	31,1	2,63% (1 caso de GC con micrometástasis)	(27 micrometástasis, 11 macrometástasis)
Jeruss et al., 2005	73	28	0	
Naik et al., 2004	210	31	0,25	No especificado
Hwang et al., 2007	196	9,5	0 recidivas locales, 0,5% supraclavicular. 1,5 met. a distancia	Micrometástasis en su mayoría

Con este propósito algunos centros han desarrollado nomogramas que permiten estimar las tasas de recaída axilar en pacientes con GC positivos, en función de los factores que

son predictivos de afectación axilar: como la permeación vascular, el tamaño y el grado histológico tumoral, el tamaño de metástasis axilar y el número de ganglios positivos y omitir en los casos considerados de bajo riesgo la disección axilar (Park et al., 2007).

Existen varias guías con diferentes recomendaciones sobre el estudio histopatológico del ganglio centinela, pero no hay un consenso común. Es más, dentro del EWGBSP (*European Working Group for Breast Screening Pathology*), formado por 240 departamentos de patología, los criterios no son homogéneos (Cserni, 2006). Existen diferencias de criterio sobre el número de secciones por ganglio que deben ser procesadas, el número de niveles examinados, la distancia entre niveles, y si se debe o no procesar la muestra hasta la extinción total.

En la mayoría de instituciones un primer abordaje al diagnóstico del ganglio centinela se efectúa durante la intervención quirúrgica, donde se realiza de forma rápida secciones congeladas o bien improntas citológicas. En el primer caso, la sensibilidad oscila entre el 55-91%, y el porcentaje de falsos negativos entre el 9-45%. En el caso de las improntas citológicas, la sensibilidad es del 46-99% y la tasa de falsos negativos del 5-70% (Cserni et al., 2003). Ambos métodos preoperatorios son adecuados para detectar metástasis de gran tamaño, pero no lo son para detectar micrometástasis (Zgajnar et al., 2004).

El análisis anatomopatológico ha intentado incrementar la detección de micrometástasis a través de la introducción de técnicas como los cortes seriados y la IHQ.

Los cortes seriados aumentan la detección a medida que profundizamos en el número de cortes y en los niveles examinados. La frecuencia de metástasis detectadas es proporcional al número de secciones histopatológicas analizadas. La IHQ aumenta la detección al ser una técnica más sensible, aunque no completamente específica; lo que facilita la detección de micrometástasis y células tumorales aisladas.

Las citoqueratinas se han empleado como marcador epitelial de micrometástasis debido a que la mayoría de los tumores de mama infiltrantes expresan dichas proteínas. En el epitelio

mamario normal, las células lumbinales del ducto, expresan KRT8, 18 y 19. La mayoría de tumores de mama infiltrante, muestran fenotipo luminal, expresando una o más de estas KRTs. El estudio sobre TMAs (*microarrays* de tejido), utilizando anticuerpos, ha mostrado la frecuencia de cada subtipo de KRTs en los tumores infiltrantes de cáncer de mama - Abd El-Rehim - sobre una población de 1944 tumores, muestra que la mayoría de tumores infiltrantes son de origen luminal, y expresan KRT 7/8, 18 y 19, en el 98,3%, 88,7% y 92,8% de las ocasiones (Abd El-Rehim et al., 2004).

En el diagnóstico de micrometástasis mediante IHQ, la mayoría de grupos utilizan una combinación de anticuerpos que reconocen varios antígenos de KRTs diferentes, aunque también se puede utilizar anticuerpos que reconocen un epítipo común a diferentes KRTs. (Pantel & Brakenhoff, 2004; Ring et al., 2004).

En el diagnóstico molecular, el marcador más utilizado ha sido la KRT19. La KRT19 es un marcador de elevada sensibilidad, pero dependiendo del diseño experimental del estudio, puede resultar un marcador específico o no. La falta de especificidad puede ser debida a la transcripción ilegítima (solucionable con los termocicladores *Real Time*) y a la presencia de pseudogenes (solucionable con un diseño apropiado de los *primers*). Otros factores que pueden reducir la especificidad de dicho marcador y que afectan especialmente al diagnóstico de células circulantes en sangre periférica son: la contaminación durante la extracción de la muestra y la sobreexpresión debido a condiciones inflamatorias y neutropenia (Ring et al., 2004).

En nuestro estudio - la detección de micrometástasis - se ha llevado a cabo empleando las KRTs 7/8 (clon CAM 5.2) en el caso del análisis IHQ y de la KRT19 en el caso del análisis molecular, ambos marcadores se expresan en la mayoría de tumores de mama con fenotipo luminal y poseen patrones de expresión IHQ, muy similares entre ellos. Se podría especular que ambos marcadores serían menos útiles en la detección de micrometástasis de origen basal (KRT5/6 y 14). Willipinski-Stapelfeld et al. analizan 1944 casos utilizando TMAs para determinar la frecuencia de los diferentes patrones de expresión y observan que 0,8% de los casos muestran expresión exclusiva de 1 o más marcadores de tipo basal y 0,4% fenotipo nulo, mientras que la mayoría de tumores muestran fenotipo luminal exclusivo (71,4%), o un

fenotipo mixto luminal basal – presencia de expresión de un marcador o más luminal con un marcador o más basal (27,4%)(Willipinski-Stapelfeldt et al., 2005).

Los datos publicados por diferentes autores sobre el análisis histopatológico del ganglio centinela han permitido observar que la combinación de las secciones seriadas y la IHQ aumentan las tasas de detección de micrometástasis entre el 9 y el 47%. Tanta variabilidad es reflejo de la heterogeneidad de la metodología aplicada y de las características particulares de cada una de las series tumorales analizadas (Cserni et al., 2003).

Si comparamos nuestra serie de tumores infiltrantes con series de características tumorales y protocolos histopatológicos parecidos, los valores de detección son muy similares. Nuestra serie de 695 tumores infiltrantes con una media de tamaño tumoral de 14,95 mm (rango entre 2 y 67 mm), con análisis histopatológico de 5 niveles (3 mediante H&E y 2 mediante IHQ) identifica en el 19% de los casos analizados, metástasis y micrometástasis. Estos valores coinciden con los publicados por otros autores como: Wong et al. con 973 casos y análisis histopatológico de cortes seriados con H&E y 2 niveles mediante IHQ que identifica en el 18% de los casos analizados, metástasis y micrometástasis (Wong et al., 2001).

Si revisamos la literatura, comprobamos que los índices de detección aumentan a medida que se incrementa el uso de la IHQ. Fréneaux et al., analizan una serie de 103 casos con una media de tamaño tumoral de 17,4 mm (rango entre 5 y 50 mm), y examinan por bloque 6 niveles (1 mediante H&E y 6 mediante IHQ). El resultado del estudio revela que el 62% de los casos son positivos mediante técnicas anatomopatológicas (Freneaux et al., 2002). Al comparar con otra serie como la de Dowlatshahi et al. con 54 pacientes - media de tamaño tumoral de 13,5 mm (rango 2-36 mm) – en donde se estudian los casos mediante seriado completo del bloque cada 0,25mm con IHQ. El análisis exhaustivo de los ganglios mediante IHQ es capaz de detectar un 58% de casos positivos (Dowlatshahi et al., 1999).

La mayoría de los depósitos metastásicos que se ponen de relieve mediante estos procedimientos intensivos son células tumorales aisladas o micrometástasis, ya que la mayor parte de metástasis de tamaño grande se evidencian al seccionar al ganglio por la mitad. En

términos prácticos, Fréneaux et al. al analizar la información que suministra la IHQ en cada uno de los niveles, comprueba que el 95% de los resultados se obtienen con el análisis de los 3 primeros niveles. En la mayoría de casos, la detección de micrometástasis en los niveles subsiguientes coincide con detección en los primeros niveles.

Al margen del diseño del protocolo de análisis histopatológico de los ganglios, otro factor que influye en la variabilidad de los resultados es el examen visual histopatológico. Mediante el método de detección celular supervisado por ordenador (CACD), se ha observado que un 15% de los ganglios diagnosticados como negativos (mediante H&E e IHQ), presentan metástasis de tamaño entre 0,01 y 0,10 mm y que la probabilidad de no detectarlas aumenta a medida que disminuye el tamaño de éstas (Weaver et al., 2006).

Parece claro que a medida que se utilizan métodos más sensibles y se profundiza en el análisis histopatológico de los ganglios, el porcentaje de micrometástasis y células tumorales aisladas detectadas aumenta. Se ha de tener en cuenta que el volumen de ganglio no analizado puede contener células tumorales o micrometástasis no detectadas.

La tendencia a realizar un examen más exhaustivo en uno o pocos ganglios por paciente, ha permitido evolucionar hacia la utilización de técnicas más sensibles como la IHQ y la RT-PCR, como técnica de diagnóstico molecular aún más sensible. Esta evolución queda reflejada en la estadificación propuesta por el *American Joint Commission for Cancer (AJCC)*; con la incorporación de los pN0(mol+) como aquellos casos con evidencia molecular de enfermedad metastásica, pero sin traducción histopatológica.

Uno de los principales recelos que despertó la utilización de métodos moleculares en el diagnóstico fue el elevado porcentaje de casos en los que detectaba células tumorales. Una vez solucionados los problemas de falsos positivos debidos a la detección de pseudogenes mediante la mejora del diseño experimental y a los niveles de expresión mínimos con el uso de termocicladores *Real-Time* se comprobó que los índices de detección moleculares no son tan dispares, como se habían vislumbrado en un principio. Por otro lado, existe una problemática similar al análisis histopatológico al evaluar las técnicas de diagnóstico molecular utilizadas en el

diagnóstico de metástasis. No existen protocolos consensuados entre los distintos grupos y la variabilidad abarca la cantidad de tejido empleada, el tipo y número de marcadores utilizados, y el establecimiento de un nivel umbral de expresión en el caso de plataformas *Real Time*.

En nuestro estudio el 19,9 % de los casos analizados son ganglios en los que se ha detectado afectación exclusivamente mediante técnicas moleculares - pN0(mol+)(sn) - . De igual forma que la utilización de los cortes seriados y la IHQ contribuyeron al aumento en la detección de metástasis, la utilización de la RT-PCR ha demostrado ser una técnica más sensible, detectando células tumorales entre el 15 y el 40% de los ganglios negativos diagnosticados mediante técnicas anatomopatológicas (Siziopikou et al., 1999).

La utilización de las nuevas plataformas *Real-Time* nos han permitido establecer un punto de corte para los niveles de expresión "dudosos" que se observaban en un principio con la utilización de la RT-PCR clásica. Para ello hemos utilizado como *gold standard* el análisis histopatológico, de tal forma que los valores observados en los porcentajes de detección se aproximan al de las series en las que se han realizado cortes seriados e inmunohistoquímica en gran número de niveles, pero se alejan de los valores sorprendentemente elevados, que generaron recelo (Mori et al., 1995). Podemos pensar que el establecimiento de un punto de corte mediante técnicas anatomopatológicas hace que trabajemos con niveles de expresión "conservadores".

En nuestra serie de tumores infiltrantes, mediante técnicas moleculares el 36% de los casos estudiados son positivos. La contribución de las técnicas anatomopatológicas y moleculares a la detección de micrometástasis es del 38%. Dichos valores están de acuerdo con la literatura publicada sobre el tema.

En el cáncer de mama invasivo la utilización de factores pronósticos y predictivos permite tomar decisiones sobre el manejo y tratamiento de la enfermedad. Se tratan de factores o parámetros que se han podido asociar a una determinada supervivencia, global o libre de enfermedad, en ausencia de tratamiento adyuvante.

A través de la serie de tumores infiltrantes hemos evaluado si la detección de metástasis o micrometástasis mediante análisis histopatológico o/y molecular está relacionada con algunas de las características histopatológicas de los tumores. Para ello analizamos las principales características tumorales que se registran en el estudio anatomopatológico de los tumores de mama como son el tipo histológico, el tamaño, la permeación vascular, la multicentricidad y la contralateralidad, el grado histológico, la expresión de receptores hormonales, la sobreexpresión o amplificación del oncogén HER2-neu y otros factores derivados de la integración de varios parámetros anteriores como son la clasificación molecular de los tumores o la clasificación de riesgo de St. Gallen.

Si estudiamos la serie desde el punto de vista de los tipos histológicos de pronóstico favorable; y nos fijamos en los tumores de tipo tubular, coloide, papilar y medular como en aquellos tumores con bajo riesgo de afectación axilar, se pueden extraer pocas conclusiones, ya que el número de casos es pequeño y no posee suficiente potencia estadística. En el caso de los tumores micropapilares y tubulares, los dos tipos de diagnóstico realizados coincidieron en las tasas de detección. En el caso de los tumores de tipo coloide y medular, mediante estudio anatomopatológico no se detectó ninguna metástasis axilar, aunque el estudio molecular detectó positividad en dos casos respectivamente.

Otro grupo histológico de pronóstico favorable lo constituye la población de carcinoma in situ (DCIS) y microinvasivos. El tipo histológico de los DCIS se definen por una proliferación de células tumorales de origen epitelial, limitado a los ductos sin evidencia de invasión de la membrana basal. Teóricamente, al no producirse dicha invasión, la incidencia de que se produzca diseminación a los ganglios axilares o metástasis a distancia es teóricamente cero. Por lo tanto, se debate el valor de la estadificación axilar en este grupo de pacientes. No obstante, cabe recordar que entre 1 y 2% de las pacientes con DCIS mueren debido a la enfermedad y que la revisión histológica de linfadenectomías de series de pacientes con DCIS revelan aproximadamente un 1% de metástasis. La introducción de la técnica del ganglio centinela ha permitido también en este grupo de pacientes estudiar de forma exhaustiva un menor volumen tisular y reducir la morbilidad asociada a la linfadenectomía.

En pacientes diagnosticados de DCIS puro, la utilización de cortes seriados e IHQ en ganglios centinela incrementan las tasas de detección hasta el 18%. Una de las razones argumentadas a favor de la realización del ganglio centinela en pacientes con exclusivamente DCIS, es la posibilidad rescatar los casos con focos de carcinoma microinfiltrante, ya que pueden pasar inadvertidos durante el examen histopatológico de la pieza tumoral. En la siguiente tabla (Tabla 88) se recogen los datos publicados sobre la detección de metástasis en casos de DCIS, exclusivamente mediante técnicas anatomopatológicas. El número de casos evaluados (excluyendo nuestro estudio) es de 2196 y el porcentaje de detección medio de GC positivos es del 4% (van Deurzen et al., 2007). Muchos de los casos detectados se trataban de micrometástasis detectadas mediante IHQ. En los dos estudios que muestran mayor número de casos, el 79% y el 56% de los ganglios positivos presentaban exclusivamente micrometástasis (Veronesi et al., 2005; Wilkie et al., 2005). En nuestra serie de tumores de carcinoma in situ, sobre una muestra de 73 casos se detectó un 16,7% de positividad exclusivamente mediante técnicas moleculares. Este resultado coincide con los valores publicados.

Hay que destacar que en las revisiones consultadas todos los casos de GC positivo sobre los que realizó linfadenectomía no presentaron ganglios adicionales con afectación. Además, en los estudios prospectivos de Lara et al. - analizó una serie de 102 pacientes con DCIS y detectó micrometástasis en el 13% de los casos analizados, tras una media de seguimiento de las pacientes de entre 10 y 28 años - ninguna de las pacientes con micrometastasis desarrolló recidiva (Lara et al., 2003). Podemos suponer que el impacto clínico de las micrometástasis en los tumores DCIS pueda ser menor.

Tabla 88: Resumen de los estudios realizados sobre GC de pacientes con diagnóstico final de DCIS.

Autor y Año	Nº tumores DCIS	GC positivo (%)	GC positivo con linfadenectomía	Pacientes con metastásis axilares(%)
Klauber-DeMore et al., 2000	72	5 (7%)	Desconocido	Desconocido
Kelly et al., 2003	41	1 (2%)	1	0
Farkas et al., 2004	46	0 (0%)	0	
Trisal et al., 2004	15	0 (0%)	0	
Buttarelli et al., 2004	41	3 (7%)	4	0
Zavagno et al., 2007	102	1 (1%)	0	0
Mittendorf et al., 2005	34	6 (18%)	2	0
Giard et al., 2004	55	1 (2%)	0	
Yen et al., 2005	99	3 (3%)	1	0
Schrenk et al., 2005	29	0 (0%)	0	
Wilkie et al., 2005	559	27 (5%)	Desconocido	Desconocido
Camp et al., 2005	25	1 (4%)	0	
Veronesi et al., 2005	508	9 (2%)	8	0
Torok et al., 2006	40	2 (5%)	0	
Cserni et al., 2006	36	4 (11%)	4	0
Katz et al., 2006	110	8 (7%)	2	0
Mabry et al., 2006	171	10 (6%)	0	
Sakr et al., 2006	39	4 (10%)	4	0
Leidenius et al., 2006	74	5 (7%)	3	0
Fraile et al., 2006	92	1 (1%)	0	
UMC Utrecht (no publicado), 2006	8	0 (0%)	0	0
Estudio actual, 2007	73	10 (13, 7%)	0	0

GC = Ganglio centinela.

El carcinoma microinvasivo (DCISM) es un tipo especial de carcinoma ductal in situ, poco frecuente, que representa el 1% de todos los casos de cáncer de mama. Se caracteriza por presentar una o más focos infiltrantes de 1 mm o menos, en su diámetro máximo. El potencial de este tipo de tumores para metastatizar a la axila ha sido estudiado, y los valores de detección publicados varían entre el 0 y el 27,3% (Tabla 89). Esta variabilidad refleja probablemente los diferentes criterios utilizados para definir el estado de microinvasión y la variabilidad de los protocolos histopatológicos empleados.

Tabla 89: Revisión de la detección de afectación axilar en pacientes con DCISM sobre las que se realizó la técnica de linfadenectomía o ganglio centinela.

Autor y Año	Estadificación axilar	Nº pacientes	Afectación Axilar (%)
Wong et al., 1990	LA	41	0 (0)
Wong et al., 2002	GC	24	2(8)
Rosner & Lane, 1991	LA	36	1 (2,7)
Silver & Tavassoli, 1998	LA	38	0 (0)
Jimenez & Visscher, 1998	LA	69	5 (7,2)
Le Bouedec et al., 1999	LA	60	3 (5)
Padmore et al., 2000	LA	11	(0) 0
Wasserberg et al., 2002	LA	57	3 (5,3)
Yang et al., 2003	LA	26	0 (0)
Le Bouedec et al., 2005	LA	107	8 (7,5)
Zavotsky et al., 1999	GC	14	2 (14,3)
Klauber-DeMore et al., 2000	GC	31	3 (9,7)
Intra et al., 2003	GC	41	4 (9,7)
Zavagno et al., 2007	GC	43	4 (9,3)
Broekhuizen et al., 2006	LA	11	3(27,3)
Estudio actual, 2007	GC	14	2(14,3)*/4(28,6)**

LA =Linfadenectomía axilar, GC = Ganglio centinela.

(*): pN1a, (**): pN0(mol+)

Los datos publicados indican que la utilización de la técnica del GC ha aumentado las tasas de detección de metástasis en el grupo de tumores DCISM. La aparición de la técnica del GC ha permitido ofrecer a este grupo de pacientes un tratamiento alternativo a la linfadenectomía sin comprometer la información pronóstica del estado axilar.

En nuestra serie estudiamos 14 casos de tumores pT1mic (con microinvasión inferior a 0,1 cm en su mayor dimensión). El 57,1% de los casos resultaron negativos - pN0 - el 28,6% resultaron positivos mediante PCR - pN0(mol+)(sn) - y se detectaron metástasis en 2 casos (14,3%) - pN1a(sn). Al analizar las características tumorales, el bajo número de muestras disponibles no permite encontrar relaciones significativamente estadísticas entre dichas características y el estado del ganglio centinela.

Si analizamos los rasgos clinicopatológicos de los tumores pT1mic junto con los tumores invasivos de menor tamaño, pT1a y pT1b, comprobamos que los primeros muestran en nuestra serie un conjunto de características de peor pronóstico. Constatamos así una tendencia al aumento en el porcentaje de tumores PT1mic que muestran grado histológico elevado y la ausencia de expresión de receptores hormonales, frente a tumores clasificados como pT1a y pT1b. Así, el 57% de los tumores pT1mic son de grado 3, frente al 25 y 20% de los tumores pT1a y pT1b. El 62% de los tumores PT1mic muestran faltan de expresión del RP, frente al 29 y 25% de los tumores pT1a y pT1b respectivamente. El 23% muestran faltan de expresión del RE, frente al 21 y 10% de los tumores pT1a y pT1b.

El análisis histopatológico prácticamente no distingue en porcentajes de detección de afectación ganglionar entre los tres grupos. El 14% de los pT1mic son positivos, y el 11% de los pT1a y pT1b. En cambio mediante técnicas moleculares el 43% de los PT1mic son positivos, frente el 22% de los PT1a y el 27% de los pT1b.

De igual manera, el análisis histopatológico del ganglio centinela no revela diferencias entre la ausencia de expresión de ambos receptores hormonales en el tumor y la positividad del ganglio centinela. El 16% de los ganglios metastáticos presentan ausencia de expresión de ambos receptores hormonales, frente al 12% de los ganglios negativos. Por el contrario el análisis molecular de los ganglios revela que los tumores con ausencia de expresión de ambos receptores hormonales presentan una elevada probabilidad de afectación axilar. El 58% de los tumores que no expresan receptores hormonales tienen ganglios positivos mediante técnicas moleculares, frente al 27% de los ganglios negativos ($p < 0,006$).

Al analizar el grado tumoral y la incidencia de positividad en la axila utilizando las dos estrategias de análisis, el análisis histopatológico muestra una tendencia hacia un aumento en la detección de metástasis y un mayor grado histológico tumoral (5% de los tumores de grado 1, 9% de los tumores de grado 2 y 21% de los tumores de grado 3). En el caso del análisis molecular, esta tendencia es estadísticamente significativa, el 24% de los tumores de grado 1, 23% de los tumores de grado 2 y 47% de los tumores de grado 3 resultan positivos ($p < 0,012$). Es más si evaluamos dos parámetros como son la falta de expresión de receptores tumorales en tumores de grado 3, el 60% de este tipo de tumores muestran positividad mediante técnicas moleculares ($p < 0,016$).

Podemos concluir que en nuestra serie los tumores pT1mic presentan características clínico-patológicas adversas en comparación con los tumores pT1a y pT1b. Esto podría deberse a que en la valoración de los focos de microinvasión se este subestimando el valor global de la carga tumoral, ya sea por que algunos focos pasen inadvertidos durante el examen, o por que ante la presencia de varios focos se tenga en cuenta el de mayor tamaño, y no la suma.

Aunque nuestra serie de tumores microinvasivos es pequeña, y quizás en una población de mayor tamaño no se observarían estas características, sí podemos constatar que entre los tumores de tamaño $\leq 1\text{mm}$ a 10 mm la detección de presencia de afectación ganglionar mediante técnicas moleculares esta estadísticamente relacionada con el grado tumoral elevado y la falta de expresión de receptores hormonales.

En la serie de tumores infiltrantes, los tumores de tipo histológico ductal o lobulillar infiltrante poseen mayor probabilidad de afectación axilar. El 19,5 % de los carcinomas ductales y el 34,5% de los lobulillares muestran afectación ganglionar mediante estudio anatomopatológico rutinario. Los incrementos en las tasas de detección debido al empleo de la RT-PCR es del 16,7% en el caso de los ductales y del 6,9% en el caso de los lobulillares. La elevada incidencia de positividad de los lobulillares viene condicionada por la presencia del tipo histológico pleomórfico, ya que el 80% de este tipo en nuestro análisis, presenta metástasis detectadas por cualquiera de las técnicas empleadas.

Se han publicado diferentes estudios sobre la detección de afectación axilar detectada mediante RT-PCR, y se ha intentado correlacionar la positividad de la PCR con los factores clínico-patológicos manejados habitualmente en el diagnóstico del cáncer de mama, con el fin de comprobar si la detección molecular posee valor clínico (Tabla 90).

En la siguiente tabla se recogen los principales estudios, indicando el número de marcadores empleados, el tipo de ensayo y si se han encontrado correlación con alguno de los factores clínico-patológicos estudiados. Existe una cierta variabilidad en los resultados de los diferentes grupos sobre los factores que están relacionados con la detección molecular de afectación axilar. Este resultado es sin duda fruto de los diferentes modelos experimentales seleccionados, desde el número y tipo de marcadores propuestos, hasta las características intrínsecas de la serie tumoral analizada y el tipo de RT-PCR empleada.

Tabla 90: Estudios publicados sobre la detección de afectación axilar mediante RT-PCR.

Autor y Año	N	RT-PCR	MARCADORES mRNA	CORRELACIÓN FACTORES CLINICOPATOLÓGICOS
Bostick et al., 1998b	41	Cualitativo	c-Met, $\beta 1 \rightarrow 4$ GalNAc-TT, p97	Lobulillar infiltrante, RE negativo, Grado histológico elevado
Manzotti et al., 2001	117	Cualitativo	Maspina, KRT19, CEA, MMG, M MUC1	Permeación vascular, RP positivo
Sakaguchi et al., 2003	108	Cualitativo	KRT19, EGP-2	No
Noguchi et al., 1996	126	Cualitativo	KRT19	Tamaño tumoral, Permeación vascular
Lockett et al., 1998	61	Cualitativo	c-myc, KRT19	Tamaño tumoral
Gimbergues et al., 2007	67	Real-time	KRT19, CEA, MMG	Clasificación de riesgo de St. Gallen
Gillanders et al., 2004	489	Real-time	MMG, MMG B, MUC1, CEA, PSE, KRT19, PIP	Grado histológico, Clasificación de riesgo de St. Gallen
Estudio actual, 2007	695	Real-time	KRT19	Tamaño tumoral, Grado histológico, Permeación vascular, Clasificación riesgo de St. Gallen

En nuestra serie de tumores infiltrantes la detección de células metastásicas mediante RT-PCR esta relacionada significativamente mediante análisis univariante con los factores clínico-patológicos clásicos, predictivos de afectación axilar como: el tamaño, el grado histológico, y la presencia de permeación vascular en el tumor primario.

Como sería de esperar, un aumento de la estadificación tumoral conlleva un aumento en la tasa de detección de afectación axilar mediante RT-PCR. Los tumores pT1a muestran ganglios centinelas positivos en un 22% de los casos, los tumores pT1b 27%, los tumores pT1c un 38%, los pT2 un 39%, los pT3 y pT4 un 58% ($p < 0,030$). La detección molecular aumenta de forma media, los porcentajes de detección en un 14,2% respecto al análisis histopatológico (Gráfico 31).

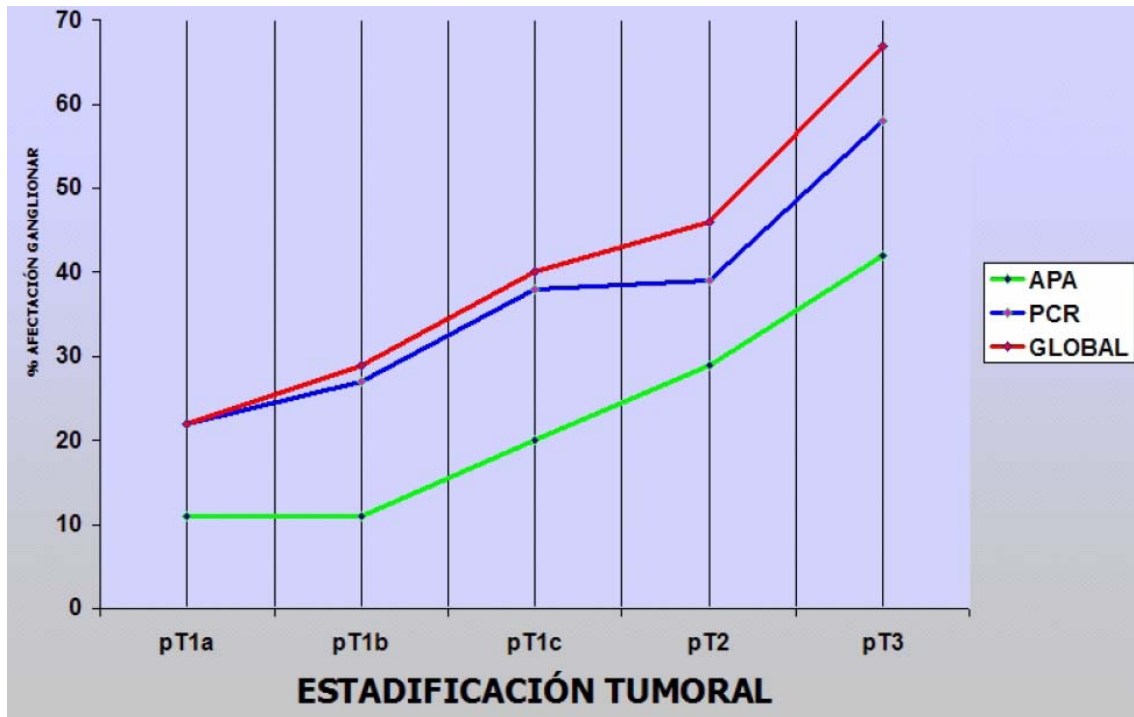


Gráfico 31: Incremento de la afectación del GC a medida que aumenta la estadificación tumoral.

Al comparar el grado histológico, también observamos que los tumores de grado 1 o 2, muestran menor probabilidad de afectación ganglionar que los tumores de grado 3 - 33% frente al 41%- ($p < 0,035$). Otro factor que está relacionado con la presencia de afectación ganglionar detectada mediante técnicas moleculares, es la presencia de permeación vascular en el tumor primario. El 54% de los tumores con permeación vascular muestran ganglios centinela positivos mediante técnicas moleculares frente al 34% de los tumores sin permeación ($p < 0,003$).

En un esfuerzo por intentar identificar grupos de pacientes con elevado riesgo de recidiva se utilizó la clasificación de riesgo de St. Gallen, que tiene en cuenta el tamaño tumoral, el grado histológico y la expresión de receptores hormonales. Encontramos diferencias significativas entre los tres grupos de riesgo el 25% de los tumores clasificados como de riesgo bajo presentan afectación del ganglio centinela detectada mediante RT-PCR, este porcentaje aumenta para los tumores de riesgo medio con una tasa de detección del 37% y para los tumores de riesgo elevado con un 41% de afectación detectada mediante RT-PCR ($p < 0,010$).

En el análisis multivariado, las variables que predicen la afectación axilar determinada mediante RT-PCR son: la presencia de permeación vascular en el tumor ($P < 0,01$, $OR = 2,138$, I.C. del 95% [1,203 y 3,799]) y la clasificación de riesgo de St. Gallen ($P < 0,04$, $OR = 1,943$, I.C. del 95% [1,241 y 3,041]).

Merece la pena subrayar que, tanto en el análisis estadístico univariado como en el multivariado sobre los factores clínico-patológicos que están relacionados con la detección de afectación ganglionar, el análisis molecular e histológico coinciden plenamente.

Un factor pronóstico clásico de gran importancia en el estudio de los tumores infiltrantes de mama, es la evaluación del HER2-neu, gen que codifica para un receptor de membrana con actividad tirosín-quinasa de 185 kDa. La sobreexpresión o amplificación del HER2 ha sido asociada como factor de mal pronóstico en el cáncer de mama infiltrante (Slamon et al., 1987). Numerosos estudios han relacionado la sobreexpresión de dicho oncogén, con otras características tumorales de mal pronóstico como el grado histológico, el tamaño tumoral, la permeación vascular, mutación de p53, ausencia de bcl2, negatividad de los receptores hormonales y con el número de ganglios linfáticos afectados.

En nuestra serie no hemos encontrado relación estadísticamente significativa entre la sobreexpresión/amplificación del HER2-neu y la afectación axilar determinada por cualquiera de las técnicas empleadas. Estos resultados coinciden con los datos publicados por algunos autores con series grandes de pacientes como la de Taucher - con 923 casos - o Bilous - con 1500 casos -(Bilous et al., 2003; Taucher et al., 2003). Sí que existe una relación estadísticamente significativa entre la sobreexpresión/amplificación del proto-oncogén y el grado histológico tumoral ($p < 1,71E^{-09}$), con la falta de expresión de los receptores hormonales ($p < 3,18E^{-06}$ para RE y $p < 2,47E^{-04}$ para RP), con elevada expresión de Ki67 ($1,68E^{-06}$) y con la presencia de permeación vascular ($p < 0,002$).

La técnica del ganglio centinela y los avances técnicos han permitido aumentar la tasa de detección de enfermedad metastásica de carga tumoral cada vez menor (desde las micrometástasis, a los *clusters* o las células tumorales aisladas). Un tema que ha centrado el interés, ha sido el de establecer un significado biológico para la carga tumoral mínima, con el fin de ofrecer un tratamiento óptimo. A partir del concepto de que las pacientes con cierta afectación axilar mínima en el momento del diagnóstico podrían tener peor pronóstico respecto a las pacientes pN0, se trataría de identificar a aquellas pacientes con riesgo de recidiva que podrían estar subtratadas. Con este fin se han realizado numerosos estudios retrospectivos para poder establecer dicho significado clínico (Cserni et al., 2003; Sakorafas et al., 2004). Los resultados obtenidos son contradictorios. La información del valor pronóstico de la afectación ganglionar en función de la carga tumoral es altamente dependiente de los métodos y protocolos anatomopatológicos empleados en su detección, del tamaño de la serie estudiada y del tiempo de seguimiento de las pacientes, entre otros factores. Además, en el análisis rutinario es más fácil obviar alguna micrometástasis o célula aislada que una macrometástasis, por lo que es posible que el grupo de los pN0, en ocasiones, esté contaminado con casos con cierta carga tumoral mínima que no ha sido detectada, pero que enmascara diferencias sutiles en el pronóstico.

Colleoni et al. analizan una serie de 1959 pacientes, relacionan factores pronósticos como la permeación vascular, el grado histológico y el tamaño tumoral con el tamaño de la afectación ganglionar. Demuestran peor supervivencia libre de enfermedad y riesgo de metastásis a distancia entre pacientes pN1a vs pN0 y de las pacientes pN0(i+)/pN1mi vs pN0. Comprueban así que la carga mínima tumoral correlaciona con peor pronóstico (Colleoni et al., 2005).

En nuestra serie de tumores invasivos, el grupo de los pN0(mol+), reúne características de mal pronóstico intermedias entre el grupo pN0 y el grupo pN0(i+). La comparación de las características agrupadas en la clasificación de St. Gallen, nos muestra que los casos detectados exclusivamente mediante técnicas moleculares están formados por un mayor número de tumores de riesgo elevado y moderado que los pN0, e inferior a los pN0(i+). El 83,8% de los

casos pN0(mol+), lo constituyen tumores de riesgo elevado y moderado, frente al 77% de los pN0 o al 94,1% de los pN0(i+) ($p < 0,020$). Un objetivo más a largo plazo sería establecer el significado biológico de los grupos pN0(mol+) y pN0(i+) con el fin de comprobar si la detección molecular o/y la detección inmunohistoquímica de células tumorales aisladas o *clusters* $< 0,2$ mm tienen efecto sobre la supervivencia global o libre de enfermedad en este grupo de pacientes.

También hemos comprobado que la sobreexpresión/amplificación del HER2-neu en el grupo pN0 (pN0, pN0(mol+) y pN0(i+)), está relacionada con el grado histológico elevado ($p < 6,39E^{-08}$), con la falta de expresión de los receptores hormonales ($p < 4,88E^{-06}$ para RE y $p < 2,23E^{-04}$ para RP) y con elevada expresión de Ki67 ($p < 1,75E^{-04}$), por lo que la sobreexpresión/amplificación de HER2-neu está relacionada con otros factores clínico-patológicos de mal pronóstico en pacientes diagnosticados con ganglios negativos.

Algunos autores han propuesto la utilización combinada de la sobreexpresión del HER2-neu con la clasificación de riesgo de St. Gallen para predecir el riesgo de recidiva en pacientes con ganglios negativos. Jong-Mu Sun demuestra que las pacientes con sobreexpresión de HER2 y riesgo medio (definido por el autor como tumores con algunas de las siguientes características RE/RP negativo, $pT > 2$ cm, grado histológico 3, o edad < 35 años) doblan en riesgo de recidiva a las pacientes con riesgo medio y sin sobreexpresión del HER2 - 26.7% vs. 11.6% - (Sun et al., 2004). Sería interesante poder comprobar a través del seguimiento de estas pacientes pN0 con sobreexpresión/amplificación del HER2-neu, si se establecen diferencias en la supervivencia global y libre de enfermedad en los distintos subgrupos pN0, pN0(mol+) y pN0(i+).

Debemos señalar que en los últimos años se ha asistido a una auténtica revolución en el análisis anatómico-patológico de la afectación axilar, gracias a la introducción de la técnica del ganglio centinela, la mejora de los protocolos histopatológicos (cortes seriados e IHQ) y la incorporación de las técnicas moleculares (termocicladores *Real-time*). Esto ha permitido estudiar con más detalle la enfermedad mínima en el ganglio axilar. En nuestra opinión la técnica molecular es útil para detectar la afectación axilar, resulta costo-efectiva y está relacionada con los mismos factores clínico-patológicos que las técnicas histopatológicas. Junto

con el análisis histopatológico se muestra como una herramienta imprescindible en el diagnóstico futuro.

Aún así, queda mucho trabajo por desarrollar. La técnica molecular debería contar con marcadores de mRNA propios (distintos a los que utiliza el diagnóstico IHQ). Los principales problemas a afrontar en la selección de un marcador se deben a las características propias de los tumores de mama, existe una elevada heterogeneidad en los niveles de expresión al estudiar diferentes casos. Otro factor que se debe sopesar es el balance entre la sensibilidad y la especificidad del marcador, ya que con frecuencia a medida que aumenta uno de los dos factores disminuye el otro. Todo ello conduce hacia el desarrollo de paneles de marcadores de mRNA.

La utilización de diferentes marcadores permite aumentar la especificidad del ensayo molecular, al modular la heterogeneidad de la expresión génica en los tumores de mama. Los marcadores ideales de panel deberían expresarse a niveles elevados en la mayoría de tumores infiltrantes de mama y en la correspondiente metástasis ganglionar, pero con niveles nulos o muy bajos en el ganglio normal.

Con ese fin se han probado diferentes aproximaciones a la búsqueda de nuevos marcadores altamente específicos. El análisis en serie de expresión génica (SAGE), junto con la combinación de secuenciación de proteínas, IHQ e inmunoensayo, y los análisis globales de expresión - en tumores y líneas celulares metastásicas - han suministrado información sobre los transcritos más abundantes, los genes que codifican para proteínas secretadas y los genes más específicos en el cáncer de mama (Lacroix, 2006).

Además de la KRT19, se han propuesto otros marcadores más específicos, para la formación de un panel. Uno de los marcadores que ha emergido con más fuerza en los últimos años, ha sido la mamaglobina (MMG). Forma parte de la familia de las secretoglobinas, junto con la mamaglobina B (MMGB) y la lipofilina B. Aunque ha demostrado ser más específico que la KRT19, muestra una expresión más limitada. El 61-93% de los tumores y metástasis de mama, muestran expresión de este marcador (Lacroix, 2006). Desafortunadamente la falta de

expresión ha sido asociada a tumores de mama de grado histológico elevado (G3) y receptores negativos, todas ellas, características de mal pronóstico (O'Brien et al., 2005; Roncella et al., 2006).

En la aplicación de la MMGB y la lipofilina B, también se ha demostrado en el tumor primario una expresión más restringida que la de la KRT19, y que no es exclusiva del tejido mamario (Brown et al., 2006). De igual manera, el factor inductor de la prolactina (PIP) exhibe niveles de expresión en las muestras tumorales muy variables, y no es universal para todos los tumores de mama (de Longueville et al., 2005).

A medida que se aplican los nuevos marcadores en los distintos estudios se pone de manifiesto que no existe el marcador con la especificidad y la sensibilidad perfecta, y que en la mayoría de los casos existe una "cierta" expresión no restringida al tejido de mama.

Las diferentes propuestas de los autores para el diseño de un panel de marcadores de mRNAs en el diagnóstico de metástasis ganglionares utilizando plataformas *Real-time* queda recogida en la siguiente tabla (Tabla 91).

Tabla 91: Paneles de marcadores de mRNA utilizados en la detección de metástasis en ganglios axilares de pacientes con cáncer de mama, mediante *Real-time PCR*.

Autor y Año	N	MARCADORES mRNA	EXACTITUD	COMBINACIÓN DE MARCADORES RECOMENDADA
Mitas et al., 2001	68	MMG, PIP, MMG B, MUC1, CEA, VEGF, HER2, c-myc, p97, vim, Ki67	MMG=0,996, PIP=0,933, KRT19=0,910 MMGB=0,996, MUC1=0,815, CEA=0,794	MMG, PIP, KRT19, MMG B, MUC1, CEA,
Gillanders et al., 2004	489	MMG, MMG B, MUC1, CEA, PSE, KRT19, PIP		MMG,CEA/ MMG , CEA, PIP y KRT19
Hughes et al., 2006	90	43 marcadores potenciales	MMG=0,896, PIP=0,896, KRT19=0,979 MMGB=0,938, TACSTD ₁ =1,0	TACSTD ₁ , PIP/KRT19, TACSTD ₁ / TACSTD ₁ , MMG y TACSTD ₁ / MMG B
Gimbergues et al., 2007	47	KRT19, CEA, MMG	KRT19=0,937, CEA=0,904, MMG=1,0	KRT19, CEA, MMG

Otra cuestión que será respondida en los próximos años es el significado pronóstico de las micrometástasis, no está claro si las pacientes con GC afectado con micrometástasis deben recibir el mismo tratamiento sistémico que las pacientes con mayor carga tumoral metastásica, con este fin existen dos ensayos clínicos en marcha – ACOSOG Z0010 y NSABP B32 (Grube & Giuliano, 2001; Krag et al., 2004).

Las técnicas moleculares han irrumpido en el diagnóstico molecular del GC, como técnicas más sensibles en la detección de células circulantes, es probable que en un futuro la biopsia del GC se utilice para caracterizar genéticamente las células liberadas por el tumor. Con esta intención se han comenzado a estudiar las pequeñas diferencias a nivel de transcriptoma, entre el tumor primario y su correspondiente metástasis ganglionar, (Feng et al., 2007), lo que ayudará a prever el posible curso de la enfermedad y ofrecer un tratamiento adecuado y óptimo a las pacientes con ganglios positivos.

CONCLUSIONES

VII. CONCLUSIONES

1. La RT-PCR clásica y la *Real-time* RT-PCR suponen un incremento en la detección de positividad del 19,62% y del 15,6% respectivamente.
 - 1.1. La cuantificación relativa de KRT19 en ganglios pN0(sn) y pN0(mol+)(sn) confirma que existe diferencias estadísticamente significativa entre los niveles de expresión.
 - 1.2. Existe relación estadísticamente significativa entre los niveles de expresión y el resultado anatomopatológico al comparar los valores de expresión de pN0(sn), pN0(i+)(sn) y pN1a(sn).
2. Existe relación directa, estadísticamente significativa entre los niveles de expresión y el resultado anatomopatológico, independientemente del método de normalización utilizado (eficiencia global de la reacción o eficiencia individual de la muestra).
 - 2.1. El método de normalización que utiliza la eficiencia global tiene mayor capacidad diagnóstica que el método que emplea la eficiencia individual.
 - 2.2. La relación entre los niveles de expresión y el resultado anatomopatológico es estadísticamente significativa independientemente de la plataforma *Real-Time* utilizada.
3. Los porcentajes de positividad de los ganglios centinela, detectados mediante técnicas histopatológicas y moleculares están relacionados estadísticamente con el tamaño tumoral, el grado (I-II vs. III), la presencia de permeación vascular en el tumor primario y la clasificación de riesgo de St. Gallen.

- 3.1. La multicentricidad y la presencia de tumores contralaterales, la expresión de receptores hormonales en el tumor primario, detectada mediante inmunohistoquímica, la sobreexpresión/amplificación del oncogén HER2/neu en el tumor primario, la clasificación molecular de los tumores, son parámetros no relacionados con la afectación ganglionar.

4. Los porcentajes de positividad de los ganglios centinela, detectados mediante técnicas histopatológicas y moleculares están relacionados estadísticamente con el tamaño tumoral, la presencia de permeación vascular en el tumor primario y la clasificación de riesgo de St. Gallen.
 - 4.1. El grado tumoral, la multicentricidad y la presencia de tumores contralaterales, la expresión de receptores hormonales en el tumor primario, detectada mediante inmunohistoquímica, la sobreexpresión/amplificación del oncogén HER2/neu en el tumor primario, la clasificación molecular de los tumores, son parámetros no relacionados con la afectación ganglionar.
 - 4.2. Los tumores lobulillares de variedad pleomórfica muestran el porcentaje más elevado de positividad de ganglios centinelas, independientemente de la técnica empleada en su detección.
 - 4.3. Los dos únicos factores que se mantienen como variables que predicen la positividad del ganglio centinela en el análisis multivariado son: la permeación vascular y la clasificación de riesgo de St. Gallen.

5. La RT-PCR es la técnica más costo-efectiva en la detección de micrometástasis.

BIBLIOGRAFÍA

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abd El-Rehim, D.M., Pinder, S.E., Paish, C.E., Bell, J., Blamey, R.W., Robertson, J.F., Nicholson, R.I. & Ellis, I.O. (2004). Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma. *J Pathol*, **203**, 661-71.
- Bhowmick, N.A., Neilson, E.G. & Moses, H.L. (2004). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*, **432**, 332-7.
- Bilous, M., Ades, C., Armes, J., Bishop, J., Brown, R., Cooke, B., Cummings, M., Farshid, G., Field, A., Morey, A., McKenzie, P., Raymond, W., Robbins, P. & Tan, L. (2003). Predicting the HER2 status of breast cancer from basic histopathology data: an analysis of 1500 breast cancers as part of the HER2000 International Study. *Breast*, **12**, 92-8.
- Bissell, M.J. & Labarge, M.A. (2005). Context, tissue plasticity, and cancer: are tumor stem cells also regulated by the microenvironment? *Cancer Cell*, **7**, 17-23.
- Bostick, P.J., Chatterjee, S., Chi, D.D., Huynh, K.T., Giuliano, A.E., Cote, R. & Hoon, D.S. (1998a). 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*, **16**, 2632-40.
- Bostick, P.J., Huynh, K.T., Sarantou, T., Turner, R.R., Qi, K., Giuliano, A.E. & Hoon, D.S. (1998b). Detection of metastases in sentinel lymph nodes of breast cancer patients by multiple-marker RT-PCR. *Int J Cancer*, **79**, 645-51.
- Broekhuizen, L.N., Wijsman, J.H., Peterse, J.L. & Rutgers, E.J. (2006). The incidence and significance of micrometastases in lymph nodes of patients with ductal carcinoma in situ and T1a carcinoma of the breast. *Eur J Surg Oncol*, **32**, 502-6.
- Brown, N.M., Stenzel, T.T., Friedman, P.N., Henslee, J., Huper, G. & Marks, J.R. (2006). Evaluation of expression based markers for the detection of breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*, **97**, 41-7.
- Buttarelli, M., Houvenaeghel, G., Martino, M., Rossi, I., Ronda, I., Ternier, F., Tallet, A. & Jacquemier, J. (2004). [Interest of sentinel lymph node biopsy for the staging of ductal carcinoma in situ]. *Ann Chir*, **129**, 508-12.
- Camp, R., Feezor, R., Kasraeian, A., Cendan, J., Schell, S., Wilkinson, E., Copeland, E. & Lind, S. (2005). Sentinel lymph node biopsy for ductal carcinoma in situ: an evolving approach at the University of Florida. *Breast J*, **11**, 394-7.
- Chambers, A.F., Groom, A.C. & MacDonald, I.C. (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer*, **2**, 563-72.

- Chelly, J., Concordet, J.P., Kaplan, J.C. & Kahn, A. (1989). Illegitimate transcription: transcription of any gene in any cell type. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 2617-21.
- Chu, K.U., Turner, R.R., Hansen, N.M., Brennan, M.B., Bilchik, A. & Giuliano, A.E. (1999). Do all patients with sentinel node metastasis from breast carcinoma need complete axillary node dissection? *Ann Surg*, **229**, 536-41.
- Colleoni, M., Rotmensz, N., Peruzzotti, G., Maisonneuve, P., Mazzarol, G., Pruneri, G., Luini, A., Intra, M., Veronesi, P., Galimberti, V., Torrì, R., Cardillo, A., Goldhirsch, A. & Viale, G. (2005). Size of breast cancer metastases in axillary lymph nodes: clinical relevance of minimal lymph node involvement. *J Clin Oncol*, **23**, 1379-89.
- Cserni, G. (2006). Histopathologic examination of the sentinel lymph nodes. *Breast J*, **12**, S152-6.
- Cserni, G., Amendoeira, I., Apostolikas, N., Bellocq, J.P., Bianchi, S., Bussolati, G., Boecker, W., Borisch, B., Connolly, C.E., Decker, T., Dervan, P., Drijckoning, M., Ellis, I.O., Elston, C.W., Eusebi, V., Faverly, D., Heikkilä, P., Holland, R., Kerner, H., Kulka, J., Jacquemier, J., Lacerda, M., Martínez-Penuela, J., De Miguel, C., Peterse, J.L., Rank, F., Regitnig, P., Reiner, A., Sapino, A., Sigal-Zafrani, B., Tanous, A.M., Thorstenson, S., Zozaya, E. & Wells, C.A. (2003). Pathological work-up of sentinel lymph nodes in breast cancer. Review of current data to be considered for the formulation of guidelines. *Eur J Cancer*, **39**, 1654-67.
- Cserni, G., Boross, G., Maraz, R., Rajtar, M., Ambrozay, E., Bori, R., Sinko, M. & Svebis, M. (2006). [Sentinel lymph node biopsy for in situ carcinoma of the breast. Experience at the Bacs-Kiskun County Hospital and review of the literature]. *Magy Seb*, **59**, 164-72.
- Cunnick, G.H., Jiang, W.G., Gomez, K.F. & Mansel, R.E. (2002). Lymphangiogenesis and breast cancer metastasis. *Histol Histopathol*, **17**, 863-70.
- de Longueville, F., Lacroix, M., Barbuto, A.M., Bertholet, V., Gallo, D., Larsimont, D., Marcq, L., Zammattéo, N., Boffe, S., Leclercq, G. & Remacle, J. (2005). Molecular characterization of breast cancer cell lines by a low-density microarray. *Int J Oncol*, **27**, 881-92.
- Devi, K.R., Kuruvila, S. & Musa, M.M. (2000). Pathological prognostic factors in breast carcinoma. *Saudi Med J*, **21**, 372-5.
- Dowlatsahi, K., Fan, M., Bloom, K.J., Spitz, D.J., Patel, S. & Snider, H.C., Jr. (1999). Occult metastases in the sentinel lymph nodes of patients with early stage breast carcinoma: A preliminary study. *Cancer*, **86**, 990-6.
- Ellis, G., Ferguson, M., Yamanaka, E., Livingston, R.B. & Gown, A.M. (1989). Monoclonal antibodies for detection of occult carcinoma cells in bone marrow of breast cancer patients. *Cancer*, **63**, 2509-14.

- Falo, C., Moreno, A., Lloveras, B., Figueras, A., Varela, M. & Escobedo, A. (2003). Algorithm for the diagnosis of HER-2/neu status in breast-infiltrating carcinomas. *Am J Clin Oncol*, **26**, 465-70.
- Fan, Y.G., Tan, Y.Y., Wu, C.T., Treseler, P., Lu, Y., Chan, C.W., Hwang, S., Ewing, C., Esserman, L., Morita, E. & Leong, S.P. (2005). The effect of sentinel node tumor burden on non-sentinel node status and recurrence rates in breast cancer. *Ann Surg Oncol*, **12**, 705-11.
- Farkas, E.A., Stoler, A.J., Teng, S.C., Bolton, J.S. & Fuhrman, G.M. (2004). An argument against routine sentinel node mapping for DCIS. *Am Surg*, **70**, 13-7; discussion 17-8.
- Feng, Y., Sun, B., Li, X., Zhang, L., Niu, Y., Xiao, C., Ning, L., Fang, Z., Wang, Y., Zhang, L., Cheng, J., Zhang, W. & Hao, X. (2007). Differentially expressed genes between primary cancer and paired lymph node metastases predict clinical outcome of node-positive breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*, **103**, 319-29.
- Fidler, I.J. & Kripke, M.L. (1977). Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science*, **197**, 893-5.
- Fisher, B., Bauer, M., Wickerham, D.L., Redmond, C.K., Fisher, E.R., Cruz, A.B., Foster, R., Gardner, B., Lerner, H., Margolese, R. & et al. (1983). Relation of number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. An NSABP update. *Cancer*, **52**, 1551-7.
- Fitzgibbons, P.L., Page, D.L., Weaver, D., Thor, A.D., Allred, D.C., Clark, G.M., Ruby, S.G., O'Malley, F., Simpson, J.F., Connolly, J.L., Hayes, D.F., Edge, S.B., Lichter, A. & Schnitt, S.J. (2000). Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med*, **124**, 966-78.
- Förster, T. (1948). Zwischemolekulare energiewanderung und fluoreszenz. *Ann. Physik*, **6**, 55-75.
- Foster, R.S., Jr. (1996). The biologic and clinical significance of lymphatic metastases in breast cancer. *Surg Oncol Clin N Am*, **5**, 79-104.
- Fraile, M., Gubern, J.M., Rull, M., Julian, F.J., Serra, C., Llatjos, M., Culell, P., Puig, P., Sola, M., Vallejos, V., Mariscal, A., Janer, J., Deulofeu, P. & Fuste, F. (2006). Is it possible to refine the indication for sentinel node biopsy in high-risk ductal carcinoma in situ? *Nucl Med Commun*, **27**, 785-9.
- Freeman, W.M., Walker, S.J. & Vrana, K.E. (1999). Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques*, **26**, 112-22, 124-5.
- Freneau, P., Nos, C., Vincent-Salomon, A., Genin, P., Sigal-Zafrani, B., Al Ghuzlan, A., Birolini, M.J., Clough, K. & Sastre-Garau, X. (2002). Histological detection of minimal metastatic involvement in axillary sentinel nodes: a rational basis for a sensitive methodology usable in daily practice. *Mod Pathol*, **15**, 641-6.

- Gadaleanu, V. & Muresan, R. (1984). Inclusions of benign nevus cells in the capsule of axillary lymph nodes in three cases of breast cancer. *Morphol Embryol (Bucur)*, **30**, 137-9.
- Gendreau, K.M. & Whalen, G.F. (1999). What can we learn from the phenomenon of preferential lymph node metastasis in carcinoma? *J Surg Oncol*, **70**, 199-204.
- Giard, S., Baranzelli, M.C., Robert, D., Chauvet, M.P., Robin, Y.M., Cabaret, V., Carpentier, P., Dugrain, M.P. & Fournier, C. (2004). Surgical implications of sentinel node with micrometastatic disease in invasive breast cancer. *Eur J Surg Oncol*, **30**, 924-9.
- Gillanders, W.E., Mikhitarian, K., Hebert, R., Mauldin, P.D., Palesch, Y., Walters, C., Urist, M.M., Mann, G.B., Doherty, G., Herrmann, V.M., Hill, A.D., Eremin, O., El-Sheemy, M., Orr, R.K., Valle, A.A., Henderson, M.A., Dewitty, R.L., Sugg, S.L., Frykberg, E., Yeh, K., Bell, R.M., Metcalf, J.S., Elliott, B.M., Brothers, T., Robison, J., Mitas, M. & Cole, D.J. (2004). Molecular detection of micrometastatic breast cancer in histopathology-negative axillary lymph nodes correlates with traditional predictors of prognosis: an interim analysis of a prospective multi-institutional cohort study. *Ann Surg*, **239**, 828-37; discussion 837-40.
- Gimbergues, P., Dauplat, M.M., Cayre, A., Durando, X., Le Bouedec, G., Finat-Duclos, F., Portefaix, G., Kwiatkowski, F., Dauplat, J., Penault-Llorca, F. & Tchirkov, A. (2007). Correlation between molecular metastases in sentinel lymph nodes of breast cancer patients and St Gallen risk category. *Eur J Surg Oncol*, **33**, 16-22.
- Giuliano, A.E., Dale, P.S., Turner, R.R., Morton, D.L., Evans, S.W. & Krasne, D.L. (1995). Improved axillary staging of breast cancer with sentinel lymphadenectomy. *Ann Surg*, **222**, 394-9; discussion 399-401.
- Group, E.B.C.T.C. (1998). Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet*, **352**, 930-42.
- Grube, B.J. & Giuliano, A.E. (2001). Observation of the breast cancer patient with a tumor-positive sentinel node: implications of the ACOSOG Z0011 trial. *Semin Surg Oncol*, **20**, 230-7.
- Guenther, J.M., Hansen, N.M., DiFronzo, L.A., Giuliano, A.E., Collins, J.C., Grube, B.L. & O'Connell, T.X. (2003). Axillary dissection is not required for all patients with breast cancer and positive sentinel nodes. *Arch Surg*, **138**, 52-6.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S. & Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*, **10**, 413-7.
- Hughes, S.J., Xi, L., Raja, S., Gooding, W., Cole, D.J., Gillanders, W.E., Mikhitarian, K., McCarty, K., Silver, S., Ching, J., McMillan, W., Luketich, J.D. & Godfrey, T.E. (2006). A rapid, fully automated, molecular-based assay accurately analyzes sentinel lymph nodes for the presence of metastatic breast cancer. *Ann Surg*, **243**, 389-98.

- Hume, D.A. (2000). Probability in transcriptional regulation and its implications for leukocyte differentiation and inducible gene expression. *Blood*, **96**, 2323-8.
- Hwang, R.F., Gonzalez-Angulo, A.M., Yi, M., Buchholz, T.A., Meric-Bernstam, F., Kuerer, H.M., Babiera, G.V., Tereffe, W., Liu, D.D. & Hunt, K.K. (2007). Low locoregional failure rates in selected breast cancer patients with tumor-positive sentinel lymph nodes who do not undergo completion axillary dissection. *Cancer*, **110**, 723-30.
- Inokuchi, M., Ninomiya, I., Tsugawa, K., Terada, I. & Miwa, K. (2003). Quantitative evaluation of metastases in axillary lymph nodes of breast cancer. *Br J Cancer*, **89**, 1750-6.
- Intra, M., Veronesi, P., Mazzarol, G., Galimberti, V., Luini, A., Sacchini, V., Trifiro, G., Gentilini, O., Pruneri, G., Naninato, P., Torres, F., Paganelli, G., Viale, G. & Veronesi, U. (2003). Axillary sentinel lymph node biopsy in patients with pure ductal carcinoma in situ of the breast. *Arch Surg*, **138**, 309-13.
- Jeruss, J.S., Winchester, D.J., Sener, S.F., Brinkmann, E.M., Bilimoria, M.M., Barrera, E., Jr., Alwawi, E., Nickolov, A., Schermerhorn, G.M. & Winchester, D.J. (2005). Axillary recurrence after sentinel node biopsy. *Ann Surg Oncol*, **12**, 34-40.
- Jimenez, R.E. & Visscher, D.W. (1998). Clinicopathologic analysis of microscopically invasive breast carcinoma. *Hum Pathol*, **29**, 1412-9.
- Katz, A., Gage, I., Evans, S., Shaffer, M., Fleury, T., Smith, F.P., Flax, R., Drogula, C., Petrucci, P. & Magnant, C. (2006). Sentinel lymph node positivity of patients with ductal carcinoma in situ or microinvasive breast cancer. *Am J Surg*, **191**, 761-6.
- Kelly, T.A., Kim, J.A., Patrick, R., Grundfest, S. & Crowe, J.P. (2003). Axillary lymph node metastases in patients with a final diagnosis of ductal carcinoma in situ. *Am J Surg*, **186**, 368-70.
- Klauber-DeMore, N., Tan, L.K., Liberman, L., Kaptain, S., Fey, J., Borgen, P., Heerdt, A., Montgomery, L., Paglia, M., Petrek, J.A., Cody, H.S. & Van Zee, K.J. (2000). Sentinel lymph node biopsy: is it indicated in patients with high-risk ductal carcinoma-in-situ and ductal carcinoma-in-situ with microinvasion? *Ann Surg Oncol*, **7**, 636-42.
- Krag, D., Harlow, S. & Julian, T. (2004). Breast cancer and the NSABP-B32 sentinel node trial. *Breast Cancer*, **11**, 221-4; discussion 264-6.
- Krag, D.N. & Weaver, D.L. (2002). Pathological and molecular assessment of sentinel lymph nodes in solid tumors. *Semin Oncol*, **29**, 274-9.
- Lacroix, M. (2006). Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer*, **13**, 1033-67.
- Lara, J.F., Young, S.M., Velilla, R.E., Santoro, E.J. & Templeton, S.F. (2003). The relevance of occult axillary micrometastasis in ductal carcinoma in situ: a clinicopathologic study with long-term follow-up. *Cancer*, **98**, 2105-13.

- Le Bouedec, G., Gimbergues, P., Feillel, V., Penault-Llorca, F. & Dauplat, J. (2005). [In situ mammary duct carcinoma with microinvasion. Which axillary lymph node exploration?]. *Presse Med*, **34**, 208-12.
- Le Bouedec, G., Penault-Llorca, F., de Latour, M., Joubert, J., Kauffmann, P., Pomel, C. & Dauplat, J. (1999). [Microinvasive ductal carcinoma of the breast. Role of axillary lymph node dissection]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*, **28**, 10-6.
- Leidenius, M., Salmenkivi, K., von Smitten, K. & Heikkila, P. (2006). Tumour-positive sentinel node findings in patients with ductal carcinoma in situ. *J Surg Oncol*, **94**, 380-4.
- Lockett, M.A., Baron, P.L., O'Brien, P.H., Elliott, B.M., Robison, J.G., Maitre, N., Metcalf, J.S. & Cole, D.J. (1998). Detection of occult breast cancer micrometastases in axillary lymph nodes using a multimarker reverse transcriptase-polymerase chain reaction panel. *J Am Coll Surg*, **187**, 9-16.
- Ma, T.S. (1995). Applications and limitations of polymerase chain reaction amplification. *Chest*, **108**, 1393-404.
- Mabry, H., Giuliano, A.E. & Silverstein, M.J. (2006). What is the value of axillary dissection or sentinel node biopsy in patients with ductal carcinoma in situ? *Am J Surg*, **192**, 455-7.
- MacDonald, I.C., Groom, A.C. & Chambers, A.F. (2002). Cancer spread and micrometastasis development: quantitative approaches for in vivo models. *Bioessays*, **24**, 885-93.
- Maiorano, E., Mazzarol, G.M., Pruneri, G., Mastropasqua, M.G., Zurrida, S., Orvieto, E. & Viale, G. (2003). Ectopic breast tissue as a possible cause of false-positive axillary sentinel lymph node biopsies. *Am J Surg Pathol*, **27**, 513-8.
- Manzotti, M., Dell'Orto, P., Maisonneuve, P., Zurrida, S., Mazzarol, G. & Viale, G. (2001). Reverse transcription-polymerase chain reaction assay for multiple mRNA markers in the detection of breast cancer metastases in sentinel lymph nodes. *Int J Cancer*, **95**, 307-12.
- McCready, D.R., Yong, W.S., Ng, A.K., Miller, N., Done, S. & Youngson, B. (2004). Influence of the new AJCC breast cancer staging system on sentinel lymph node positivity and false-negative rates. *J Natl Cancer Inst*, **96**, 873-5.
- Menes, T.S., Tartter, P.I., Mizrachi, H., Constantino, J., Estabrook, A. & Smith, S.R. (2005). Breast cancer patients with pN0(i+) and pN1(mi) sentinel nodes have high rate of nonsentinel node metastases. *J Am Coll Surg*, **200**, 323-7.
- Mitas, M., Mikhitarian, K., Walters, C., Baron, P.L., Elliott, B.M., Brothers, T.E., Robison, J.G., Metcalf, J.S., Palesch, Y.Y., Zhang, Z., Gillanders, W.E. & Cole, D.J. (2001). Quantitative real-time RT-PCR detection of breast cancer micrometastasis using a multigene marker panel. *Int J Cancer*, **93**, 162-71.

- Mittendorf, E.A., Arciero, C.A., Gutchell, V., Hooke, J. & Shriver, C.D. (2005). Core biopsy diagnosis of ductal carcinoma in situ: an indication for sentinel lymph node biopsy. *Curr Surg*, **62**, 253-7.
- Mori, M., Mimori, K., Inoue, H., Barnard, G.F., Tsuji, K., Nanbara, S., Ueo, H. & Akiyoshi, T. (1995). Detection of cancer micrometastases in lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer Res*, **55**, 3417-20.
- Naik, A.M., Fey, J., Gemignani, M., Heerdt, A., Montgomery, L., Petrek, J., Port, E., Sacchini, V., Sclafani, L., VanZee, K., Wagman, R., Borgen, P.I. & Cody, H.S., 3rd. (2004). The risk of axillary relapse after sentinel lymph node biopsy for breast cancer is comparable with that of axillary lymph node dissection: a follow-up study of 4008 procedures. *Ann Surg*, **240**, 462-8; discussion 468-71.
- Noguchi, S., Aihara, T., Motomura, K., Inaji, H., Imaoka, S. & Koyama, H. (1996). Histologic characteristics of breast cancers with occult lymph node metastases detected by keratin 19 mRNA reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer*, **78**, 1235-40.
- O'Brien, N.A., O'Donovan, N., Ryan, B., Hill, A.D., McDermott, E., O'Higgins, N. & Duffy, M.J. (2005). Mammaglobin a in breast cancer: existence of multiple molecular forms. *Int J Cancer*, **114**, 623-7.
- Osborne, M.P., Wong, G.Y., Asina, S., Old, L.J., Cote, R.J. & Rosen, P.P. (1991). Sensitivity of immunocytochemical detection of breast cancer cells in human bone marrow. *Cancer Res*, **51**, 2706-9.
- Padmore, R.F., Fowble, B., Hoffman, J., Rosser, C., Hanlon, A. & Patchefsky, A.S. (2000). Microinvasive breast carcinoma: clinicopathologic analysis of a single institution experience. *Cancer*, **88**, 1403-9.
- Pantel, K. & Brakenhoff, R.H. (2004). Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer*, **4**, 448-56.
- Park, J., Fey, J.V., Naik, A.M., Borgen, P.I., Van Zee, K.J. & Cody, H.S., 3rd. (2007). A declining rate of completion axillary dissection in sentinel lymph node-positive breast cancer patients is associated with the use of a multivariate nomogram. *Ann Surg*, **245**, 462-8.
- Pickren, J. (1956). Lymph node metastases in carcinoma of the female mammary gland. *Bull Roswell Park Mem Inst*, **1**, 79-85.
- Ramakers, C., Ruijter, J.M., Deprez, R.H. & Moorman, A.F. (2003). Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett*, **339**, 62-6.
- Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F. & Weissman, I.L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, **414**, 105-11.
- Reynolds, C., Mick, R., Donohue, J.H., Grant, C.S., Farley, D.R., Callans, L.S., Orel, S.G., Keeney, G.L., Lawton, T.J. & Czerniecki, B.J. (1999). Sentinel lymph node

biopsy with metastasis: can axillary dissection be avoided in some patients with breast cancer? *J Clin Oncol*, **17**, 1720-6.

Ring, A., Smith, I.E. & Dowsett, M. (2004). Circulating tumour cells in breast cancer. *Lancet Oncol*, **5**, 79-88.

Roncella, S., Ferro, P., Bacigalupo, B., Dessanti, P., Giannico, A., Gorji, N., Moroni, M., Tozzini, S., Pensa, F., Gianquinto, D., Fais, F., Pronzato, P. & Fedeli, F. (2006). Relationship between human mammaglobin mRNA expression in breast cancer tissue and clinico-pathologic features of the tumors. *J Exp Clin Cancer Res*, **25**, 65-72.

Rosner, D. & Lane, W.W. (1991). Should all patients with node-negative breast cancer receive adjuvant therapy? Identifying additional subsets of low-risk patients who are highly curable by surgery alone. *Cancer*, **68**, 1482-94.

Ruud, P., Fodstad, O. & Hovig, E. (1999). Identification of a novel cytokeratin 19 pseudogene that may interfere with reverse transcriptase-polymerase chain reaction assays used to detect micrometastatic tumor cells. *Int J Cancer*, **80**, 119-25.

Sakaguchi, M., Virmani, A., Dudak, M.W., Peters, G.N., Leitch, A.M., Saboorian, H., Gazdar, A.F. & Euhus, D.M. (2003). Clinical relevance of reverse transcriptase-polymerase chain reaction for the detection of axillary lymph node metastases in breast cancer. *Ann Surg Oncol*, **10**, 117-25.

Sakorafas, G.H., Geraghty, J. & Pavlakis, G. (2004). The clinical significance of axillary lymph node micrometastases in breast cancer. *Eur J Surg Oncol*, **30**, 807-16.

Sakr, R., Barranger, E., Antoine, M., Prugnotte, H., Darai, E. & Uzan, S. (2006). Ductal carcinoma in situ: value of sentinel lymph node biopsy. *J Surg Oncol*, **94**, 426-30.

Schoenfeld, A., Luqmani, Y., Sinnett, H.D., Shousha, S. & Coombes, R.C. (1996). Keratin 19 mRNA measurement to detect micrometastases in lymph nodes in breast cancer patients. *Br J Cancer*, **74**, 1639-42.

Schrenk, P., Konstantiniuk, P., Wolfli, S., Bogner, S., Haid, A., Nemes, C., Jagoutz-Herzlinger, M. & Redtenbacher, S. (2005). Prediction of non-sentinel lymph node status in breast cancer with a micrometastatic sentinel node. *Br J Surg*, **92**, 707-13.

Schroder, C.P., Ruiters, M.H., de Jong, S., Tiebosch, A.T., Wesseling, J., Veenstra, R., de Vries, J., Hoekstra, H.J., de Leij, L.F. & de Vries, E.G. (2003). Detection of micrometastatic breast cancer by means of real time quantitative RT-PCR and immunostaining in perioperative blood samples and sentinel nodes. *Int J Cancer*, **106**, 611-8.

Schweizer, J., Bowden, P.E., Coulombe, P.A., Langbein, L., Lane, E.B., Magin, T.M., Maltais, L., Omary, M.B., Parry, D.A., Rogers, M.A. & Wright, M.W. (2006). New consensus nomenclature for mammalian keratins. *J Cell Biol*, **174**, 169-74.

Silver, S.A. & Tavassoli, F.A. (1998). Mammary ductal carcinoma in situ with microinvasion. *Cancer*, **82**, 2382-90.

- Siziopikou, K.P., Schnitt, S.J., Connolly, J.L. & Hayes, D.F. (1999). Detection and Significance of Occult Axillary Metastatic Disease in Breast Cancer Patients. *Breast J*, **5**, 221-229.
- Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A. & McGuire, W.L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, **235**, 177-82.
- Sun, J.M., Han, W., Im, S.A., Kim, T.Y., Park, I.A., Noh, D.Y., Heo, D.S., Bang, Y.J., Choe, K.J. & Kim, N.K. (2004). A combination of HER-2 status and the St. Gallen classification provides useful information on prognosis in lymph node-negative breast carcinoma. *Cancer*, **101**, 2516-22.
- Taucher, S., Rudas, M., Mader, R.M., Gnant, M., Dubsy, P., Bachleitner, T., Roka, S., Fitzal, F., Kandioler, D., Sporn, E., Friedl, J., Mittlbock, M. & Jakesz, R. (2003). Do we need HER-2/neu testing for all patients with primary breast carcinoma? *Cancer*, **98**, 2547-53.
- Theodore Kim, A.E.G.G.H.L. (2006). Lymphatic mapping and sentinel lymph node biopsy in early-stage breast carcinoma. *Cancer*, **106**, 4-16.
- Torok, K., Peley, G., Matrai, Z., Bidlek, M., Szabo, E., Sinkovics, I., Polgar, C., Farkas, E., Orosz, Z. & Koves, I. (2006). [The role of sentinel lymph node biopsy in breast cancer non-involving-duct]. *Magy Seb*, **59**, 173-8.
- Trisal, V., Qian, D. & Wagman, L.D. (2004). Axillary recurrence in DCIs: is axillary lymphadenectomy warranted? *Am Surg*, **70**, 876-80.
- van 't Veer, L.J., Dai, H., van de Vijver, M.J., He, Y.D., Hart, A.A., Mao, M., Peterse, H.L., van der Kooy, K., Marton, M.J., Witteveen, A.T., Schreiber, G.J., Kerkhoven, R.M., Roberts, C., Linsley, P.S., Bernards, R. & Friend, S.H. (2002). Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*, **415**, 530-6.
- van Deurzen, C.H., Hobbelenk, M.G., van Hillegersberg, R. & van Diest, P.J. (2007). Is there an indication for sentinel node biopsy in patients with ductal carcinoma in situ of the breast? A review. *Eur J Cancer*, **43**, 993-1001.
- Van Trappen, P.O. & Pepper, M.S. (2002). Lymphatic dissemination of tumour cells and the formation of micrometastases. *Lancet Oncol*, **3**, 44-52.
- Veronesi, P., Intra, M., Vento, A.R., Naninato, P., Caldarella, P., Paganelli, G. & Viale, G. (2005). Sentinel lymph node biopsy for localised ductal carcinoma in situ? *Breast*, **14**, 520-2.
- Viale, G., Maiorano, E., Mazzarol, G., Zurrada, S., Galimberti, V., Luini, A., Renne, G., Pruneri, G., Maisonneuve, P. & Veronesi, U. (2001). Histologic detection and clinical implications of micrometastases in axillary sentinel lymph nodes for patients with breast carcinoma. *Cancer*, **92**, 1378-84.
- Viale, G., Maiorano, E., Pruneri, G., Mastropasqua, M.G., Valentini, S., Galimberti, V., Zurrada, S., Maisonneuve, P., Paganelli, G. & Mazzarol, G. (2005). Predicting the

risk for additional axillary metastases in patients with breast carcinoma and positive sentinel lymph node biopsy. *Ann Surg*, **241**, 319-25.

Wasserberg, N., Morgenstern, S., Schachter, J., Fenig, E., Lelcuk, S. & Gutman, H. (2002). Risk factors for lymph node metastases in breast ductal carcinoma in situ with minimal invasive component. *Arch Surg*, **137**, 1249-52.

Weaver, D.L. (2003). Sentinel lymph nodes and breast carcinoma: which micrometastases are clinically significant? *Am J Surg Pathol*, **27**, 842-5.

Weaver, D.L. (2005). Pathological evaluation of sentinel lymph nodes in breast cancer: a practical academic perspective from America. *Histopathology*, **46**, 702-6.

Weaver, D.L., Krag, D.N., Manna, E.A., Ashikaga, T., Waters, B.L., Harlow, S.P., Bauer, K.D. & Julian, T.B. (2006). Detection of occult sentinel lymph node micrometastases by immunohistochemistry in breast cancer. An NSABP protocol B-32 quality assurance study. *Cancer*, **107**, 661-7.

Weigelt, B., Glas, A.M., Wessels, L.F., Witteveen, A.T., Peterse, J.L. & van't Veer, L.J. (2003). Gene expression profiles of primary breast tumors maintained in distant metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 15901-5.

Weigelt, B., Peterse, J.L. & van 't Veer, L.J. (2005). Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer*, **5**, 591-602.

Wilkie, C., White, L., Dupont, E., Cantor, A. & Cox, C.E. (2005). An update of sentinel lymph node mapping in patients with ductal carcinoma in situ. *Am J Surg*, **190**, 563-6.

Willipinski-Stapelfeldt, B., Riethdorf, S., Assmann, V., Woelfle, U., Rau, T., Sauter, G., Heukeshoven, J. & Pantel, K. (2005). Changes in cytoskeletal protein composition indicative of an epithelial-mesenchymal transition in human micrometastatic and primary breast carcinoma cells. *Clin Cancer Res*, **11**, 8006-14.

Wong, J.H., Kopald, K.H. & Morton, D.L. (1990). The impact of microinvasion on axillary node metastases and survival in patients with intraductal breast cancer. *Arch Surg*, **125**, 1298-301; discussion 1301-2.

Wong, S.L., Chao, C., Edwards, M.J., Carlson, D.J., Laidley, A., Noyes, R.D., McGlothlin, T., Ley, P.B., Tuttle, T., Schadt, M., Pennington, R., Legenza, M., Morgan, J. & McMasters, K.M. (2002). Frequency of sentinel lymph node metastases in patients with favorable breast cancer histologic subtypes. *Am J Surg*, **184**, 492-8; discussion 498.

Wong, S.L., Chao, C., Edwards, M.J., Simpson, D. & McMasters, K.M. (2001). The use of cytokeratin staining in sentinel lymph node biopsy for breast cancer. *Am J Surg*, **182**, 330-4.

Yang, M., Moriya, T., Oguma, M., De La Cruz, C., Endoh, M., Ishida, T., Hirakawa, H., Orita, Y., Ohuchi, N. & Sasano, H. (2003). Microinvasive ductal carcinoma

- (T1mic) of the breast. The clinicopathological profile and immunohistochemical features of 28 cases. *Pathol Int*, **53**, 422-8.
- Yen, T.W., Hunt, K.K., Ross, M.I., Mirza, N.Q., Babiera, G.V., Meric-Bernstam, F., Singletary, S.E., Symmans, W.F., Giordano, S.H., Feig, B.W., Ames, F.C. & Kuerer, H.M. (2005). Predictors of invasive breast cancer in patients with an initial diagnosis of ductal carcinoma in situ: a guide to selective use of sentinel lymph node biopsy in management of ductal carcinoma in situ. *J Am Coll Surg*, **200**, 516-26.
- Zavagno, G., Belardinelli, V., Marconato, R., Carcoforo, P., Franchini, Z., Scalco, G., Burelli, P., Pietrarota, P., Mencarelli, R., Marconato, G. & Nitti, D. (2007). Sentinel lymph node metastasis from mammary ductal carcinoma in situ with microinvasion. *Breast*, **16**, 146-51.
- Zavotsky, J., Hansen, N., Brennan, M.B., Turner, R.R. & Giuliano, A.E. (1999). Lymph node metastasis from ductal carcinoma in situ with microinvasion. *Cancer*, **85**, 2439-43.
- Zgajnar, J., Frkovic-Grazio, S., Besic, N., Hocevar, M., Vidergar-Kralj, B., Gerljevic, A. & Pogacnik, A. (2004). Low sensitivity of the touch imprint cytology of the sentinel lymph node in breast cancer patients--results of a large series. *J Surg Oncol*, **85**, 82-6; discussion 87.
- Zippelius, A., Kufer, P., Honold, G., Kollermann, M.W., Oberneder, R., Schlimok, G., Riethmuller, G. & Pantel, K. (1997). Limitations of reverse-transcriptase polymerase chain reaction analyses for detection of micrometastatic epithelial cancer cells in bone marrow. *J Clin Oncol*, **15**, 2701-8.

