



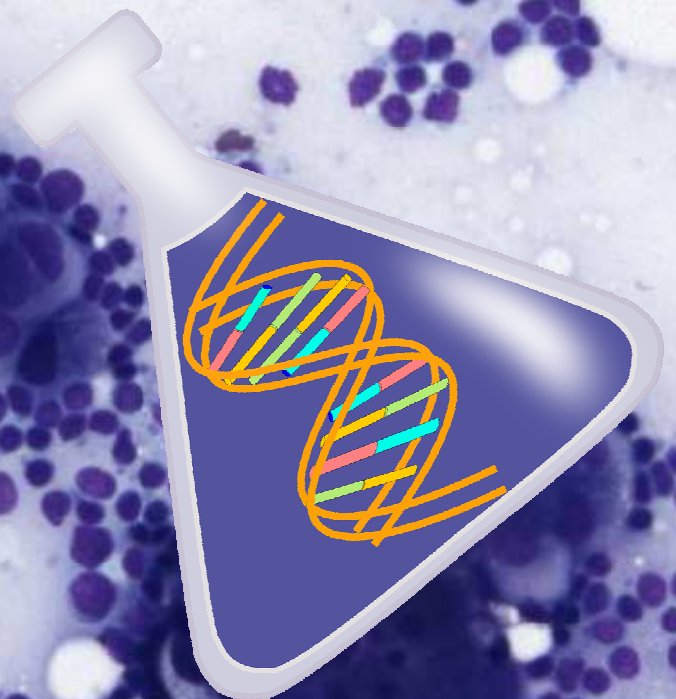
Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

**VALOR PREDICTIU DE LA CÀRREGA
TUMORAL AXIL·LAR EN CÀNCER DE MAMA
PEL MÈTODE OSNA**



UAB

Universitat Autònoma
de Barcelona

Irene Sansano Valero



Universitat Autònoma de Barcelona

Doctorat de Cirurgia i Ciències Morfològiques

Departament de Ciències Morfològiques

Facultat de Medicina

VALOR PREDICTIU DE LA CÀRREGA TUMORAL AXIL·LAR EN CÀNCER DE MAMA PEL MÈTODE OSNA

Irene Sansano Valero

Aquesta tesi ha estat elaborada al Servei d'Anatomia Patològica de l'H.U. Vall d'Hebron sota la direcció dels doctors Vicente Peg Cámara y Santiago Ramón y Cajal Agüeras essent el primer també tutor.

Ha estat dipositada l'any 2021.

Barcelona, 2021

El Dr. Santiago Ramón y Cajal, catedràtic d'Anatomia Patològica de la Facultat de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona i cap del Servei d' Anatomia Patològica de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron.

CERTIFICA:

Que la tesi titulada “**VALOR PREDICTIU DE LA CÀRREGA TUMORAL AXIL·LAR EN CÀNCER DE MAMA PEL MÈTODE OSNA**” i dirigida pels sotasignats és apta per ésser defensada davant del tribunal corresponent per optar al grau de doctora.

Prof. Santiago Ramón y Cajal

Barcelona,

Directors de la tesi:

Dr Vicente Peg Cámara

Servei d'Anatomia Patològica

H. U. Vall d'Hebron, Barcelona

Dr. Santiago Ramón y Cajal Agüeras

Servei d'Anatomia Patològica

H. U. Vall d'Hebron, Barcelona

Als meus pares: Vicent i M Esperanza, pels gens i per l'ambient

A Laia i Jesús, per la resta

Presentació

Aquesta tesi doctoral s'ha estructurat seguint la Normativa interna de la Universitat Autònoma de Barcelona per a la presentació de tesis doctorals per compendi de publicacions, aprovada per la Comissió de Doctorat de la Facultat de Medicina.

Els treballs que formen part de la memòria del projecte de tesi doctoral pertanyen a la mateixa línia d'investigació, emmarcada en el diagnòstic per tècniques moleculars de metàstasis als ganglis en pacients amb càncer de mama i el valor clínic del concepte de *càrrega tumoral*. Com a resultat d'aquests treballs s'han publicat 2 articles originals en la literatura internacional.

It is a narrow mind which cannot look at a subject from various points of view

George Eliot (1819-1880), escriptora britànica

Science progresses best when observations force us to alter our preconceptions

Vera Rubin (1926 – 2016), astrònoma estatunitenca

ÍNDEX

Abreviacions

Introducció. Plantejament general i justificació de la tesi

Hipòtesis

Objectius

Publicacions: mètodes i resultats

Discussió

Conclusions

Bibliografia

Agraïments

ABREVIACIONES

Abreviacions

AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
BAG	Biòpsia amb agulla gruixuda
BLN	<i>Breast Lymph Node Assay</i>
CDI	Carcinoma ductal infiltrant
CK19	Citoqueratina 19
CLI	Carcinoma lobel·lar infiltrant
HE	Hematoxilina-eosina
GS	Gangli sentinella
GNS	Gangli no sentinella
G-TTL	<i>Global-Total Tumoral Load</i>
LA	Limfadenectomia axil·lar
mRNA	Àcid ribonucleïc missatger
RE	Receptors d'estrògens
RMN	Ressonància Magnètica Nuclear
RP	Receptors de progesterona
RT-LAMP	<i>Reverse Transcription Loop-mediated isothermal AMplification</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
TTL	<i>Total Tumor Load</i>
OMS	Organització Mundial de la Salut
OSNA	<i>One Step Nucleic Acid Amplification</i>
UICC	<i>Union for International Cancer Control</i>

INTRODUCCIÓ

**Plantejament general i
justificació de la tesi**

1.- EVOLUCIÓ HISTÒRICA DEL CÀNCER DE MAMA:

La humanitat ha lluitat per comprendre i tractar el càncer de mama des de la primera documentació fa més de 3500 anys. El fet de ser un tumor palpable i visible en etapes avançades ha fet que es tracti d'una malaltia fàcilment identificable pels metges al llarg de la història. Malgrat això, l'elevada mortalitat associada a la forma avançada de la malaltia i connotacions culturals i sexuals pel que fa al pit han estigmatitzat les discussions sobre aquest càncer i han limitat la seva descripció en revistes clíniques i llibres de text fins a fa poc.

La nostra comprensió clínica del càncer de mama ha millorat sensiblement des de les primeres descripcions com “grumolls de bilis negra” a la moderna concepció com a una “malaltia heterogènia que presenta diversitat en histopatologia, genètica, subtipus molecular i resultat clínic”. Amés, els descobriments científics de les darreres dècades han donat lloc a noves i millors maneres de prevenir, detectar, diagnosticar i tractar el càncer de mama. He volgut fer un petit resum de les fites més destacades de la seva evolució històrica ¹.

La primera descripció documentada del càncer de mama es troba als papirs d'Ebers i d'Edwin de l'antic Egipte ². En ells es parla de tumoracions al pit que es descriuen com incurables malgrat el tractament ³. Altres textos assiris, indis i grecs parlen de tumoracions mamàries (que podrien ser malignes o benignes) ⁴.

L'any 460 A.C., Hipòcrates, va incloure el càncer en general en la seva teoria dels humors, considerant-lo causat per un excés de bilis negra. Li va donar el nom de *karkinos*, que vol dir “cranc” en grec, doncs li recordava la forma. Segons qui és considerat com el pare de la medicina occidental era millor no tractar els tumors amb cirurgia donat que aquesta era més perillosa que la pròpia malaltia⁵.

Galè, en el 200 D.C., va desenvolupar aquesta teoria. Va descriure un tipus de cirurgia conservadora i tractaments alternatius com opi, oli de ricí o sulfur⁶. Malgrat això les mastectomies radicals sense anestèsia van seguir fent-se al llarg de l'edat mitjana.

La Teoria dels humors de Galè es van mantenir fins al segle XVII, on diversos autors hi van oposar les seves hipòtesis. Descartes proposà un origen limfàtic ⁷, Sylvius una alteració en el balanç àcid-base ⁸. Hunter, desenvolupà la hipòtesi de l'origen limfàtic i proposà una cirurgia amb extirpació de les rutes limfàtiques ⁹.

En el s.XVIII LeDran observà que el càncer de mama avançava en etapes i que era necessari extirpar els tumors abans que s'estenguessin als ganglis limfàtics de les aixelles ¹⁰.

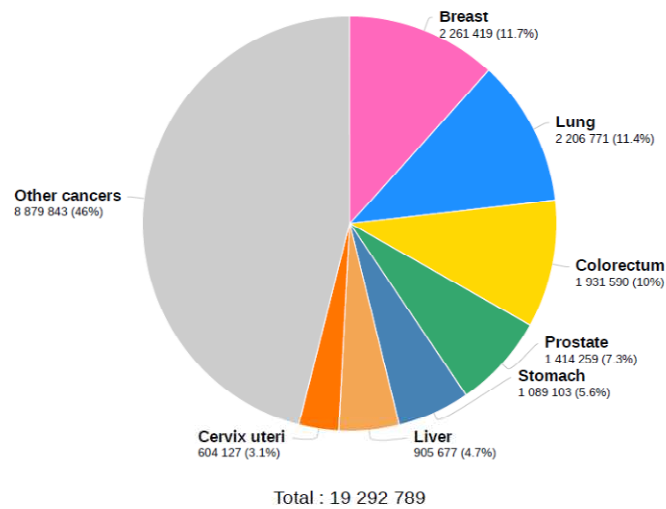
Al sXIX Virchow va concloure que el càncer estava format per cèl·lules i també es produïren grans avenços en cirurgia derivats del descobriment de l'anestèsia i l'antisèpsia ¹¹. En aquest context, Halsted introduí la mastectomia radical, que consistia en l'extirpació de tot el pit amb els pectorals i el contingut de l'aixel·la, obtenint uns resultats espectaculars pel que feia a la recidiva local, no tant a la supervivència global ³. Aquesta intervenció fou el *gold-standard* fins ben entrat el sXX. El sXIX també té l'honor del naixement de l'hormonoteràpia, a partir de l'observació de Beatson de regressions temporals de càncers de mama metastàtics després d'ooforectomia ¹².

El segle passat introduí la cirurgia conservadora, la radioteràpia, la quimioteràpia i els estudis epidemiològics que han portat al diagnòstic i tractament precoç del càncer de mama ¹. Fites importants en aquest sentit han estat la introducció del concepte de gangli sentinella (GS)¹³, un primer gangli que si és negatiu permetia estalviar-se el buidament axil·lar, i més recentment, els estudis de Giuliano que han demostrat que és possible no fer el buidament inclús quan aquest GS és positiu ¹⁴.

2.- EPIDEMIOLOGIA I FACTORS DE RISC:

El càncer de mama és la neoplàsia més diagnosticada a tot el món, amb més de 2.000.000 casos/any, així com la principal causa de mort per càncer en dones ¹⁵.

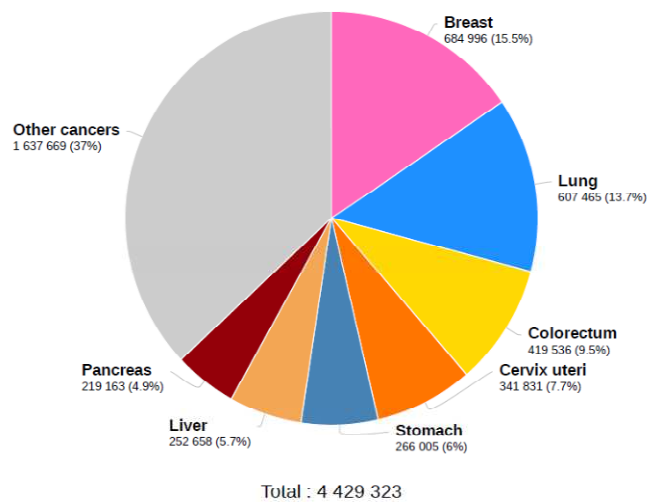
Estimated number of new cases in 2020, worldwide, both sexes, all ages



Data source: Globocan 2020
Graph production: Global Cancer Observatory (<http://gco.iarc.fr>)

International Agency for Research on Cancer
World Health Organization

Estimated number of deaths in 2020, worldwide, females, all ages



Data source: Globocan 2020
Graph production: Global Cancer Observatory (<http://gco.iarc.fr>)

International Agency for Research on Cancer
World Health Organization

Figura1 . Incidència i mortalitat per càncer de mama en dones al món

La seva incidència és més alta als països més desenvolupats, es pensa que com a conseqüència de canvis socials resultants de la industrialització (l'augment de la ingesta de greix, el sobrepès, la data de la menarquia i/o lactància, paritat, etc.) ¹⁵

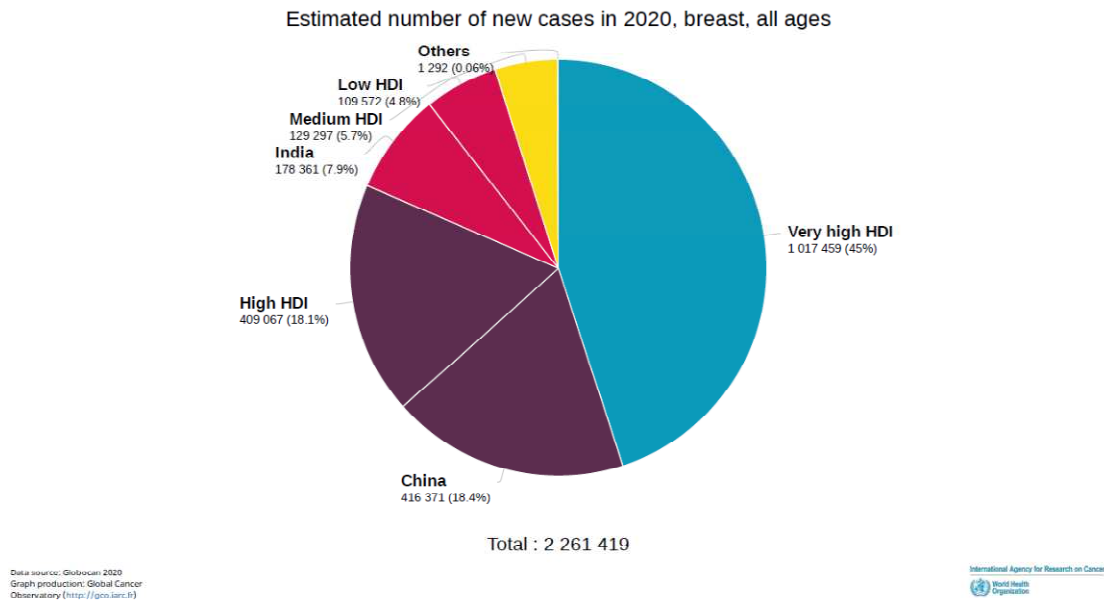


Figura 2. Incidència i mortalitat per càncer de mama en dones en la població mundial segons l'índex de desenvolupament humà (HDI)

En el desenvolupament de càncer de mama intervenen diferents factors ¹⁶:

- Edat i sexe
- Ètnia i raça
- Malaltia mamària benigna anterior
- Antecedents familiars de càncer de mama: gens *BRCA1* i *BRCA2*
- Factors hormonals
- Estil de vida (dieta, factors reproductius).

3.- CARACTERÍSTIQUES CLÍNiques:

Signes i símptomes: en països amb programes de cribratge de càncer de mama, el primer signe de malaltia acostuma a ser una troballa anormal en la mamografia de control. No obstant això, fins a un 15% de les dones es diagnostiquen per una lesió no vista a la mamografia i un 30% per una que apareix entre mamografies de control ¹⁷.

Segons l'estadi observem:

- Nòdul mamari: és tracta d'una tumoració palpable al pit i és el signe més comú de càncer de mama. La major part de nòduls però són benignes. Les característiques indicatives de malignitat són: duresa, falta de mobilitat i vores irregulars. No obstant, aquests trets no són diagnòstics i es requereixen estudis addicionals per tal d'identificar la naturalesa d'una lesió. Altres signes menys comuns inclouen la retracció i/o ulceració de la pell, inversió o descàrrega del mugró, i canvis en el color o textura de la pell.
- Malaltia localment avançada: inclou adenopaties axil·lars i canvis en la pell com eritema, engruiximent o "pell de taronja", que suggereixen invasió dels vasos limfàtics dèrmics per èmbols de carcinoma.
- Malaltia metastàtica: els diferents signes i símptomes depenen dels òrgans afectats. Els més freqüentment implicats són els ossos (dolor), el fetge (dolor abdominal, nàusees, icterícia) i pulmons (dispnea, tos).

Radiologia: la mamografia és el mètode fonamental de cribratge per al càncer de mama en dones majors de 40 anys, sent l'ecografia la prova utilitzada en pacients més joves. Les troballes característiques de la mamografia inclouen la presència d'un nòdul i microcalcificacions agrupades. Si es tracta d'una lesió espiculada, la probabilitat de malignitat arriba fins al 90%. L'estudi d'ultrasons s'utilitza sovint per discernir entre benignitat i malignitat en una lesió. Les característiques d'un procés maligne són l'espiculació, l'hipoecogenicitat, la microlobel·lació, i les microcalcificacions.

La ressonància magnètica nuclear (RMN) és la prova més sensible per al cribratge de càncer de mama, s'utilitza com a tècnica d'elecció per a pacients amb alt risc de càncer (per exemple, dones que porten mutacions BRCA1 o BRCA2) o per l'estadi del carcinoma lobel·lar infiltrant (CLI). Les lesions malignes capten gadolini, tenen vores irregulars i un aspecte heterogeni.

Malgrat la gran capacitat de la radiologia per caracteritzar les lesions benignes sempre és necessari un diagnòstic histològic que confirmi la malignitat. La biòpsia amb agulla gruixuda (BAG) és el mètode d'elecció més emprat amb aquesta finalitat.

4.- ANATOMIA PATOLÒGICA:

La classificació actual dels tumors malignes de mama de l'Organització Mundial de la Salut (OMS) reconeix 21 neoplàsies primàries d'origen epitelial. La més freqüent és el carcinoma infiltrant no especial (CINE), conegut com carcinoma ductal infiltrant, que representa entre el 40% i el 75% de les neoplàsies malignes segons les sèries, seguit pel CLI, que representa entre el 5 i el 15% dels casos ¹⁶.

Carcinoma infiltrant no especial: rep aquest nom perquè el seu diagnòstic es basa en l'exclusió de qualsevol altre tipus especial de carcinoma. Macroscòpicament són tumors de mida variable, des de lesions microscòpiques <10 mm fins a masses de >100 mm. Acostumen a ser espiculats o estrellats, encara que poden tenir una morfologia nodular. Són fermes al tall i solen tenir coloració blanc-grisosa amb estries groguenques a l'interior.



Figura 3. Imatge macroscòpica d'un CINE. Observeu les vores espiculades i la coloració blanquinosa de la lesió.

Des del punt de vista microscòpic, la morfologia pot ser molt variable doncs es tracta d'un diagnòstic d'exclusió. Pot tenir marges infiltrants o expansius, un

patró de creixement cordonal, en nius, trabècules o grups molt més grans, sòlids o sincicials o bé formant glàndules o túbuls ben definits. A nivell citològic també s'observa gran variabilitat. Els citoplasmes solen ser abundants i eosinòfils amb nuclis regulars i uniformes o pleomòrfics i amb abundants nuclèols. Poden tenir escàs estroma o abundant proliferació fibroblàstica o esclerosi. L'índex mitòtic i la presència de necrosi també són variables ¹⁶.

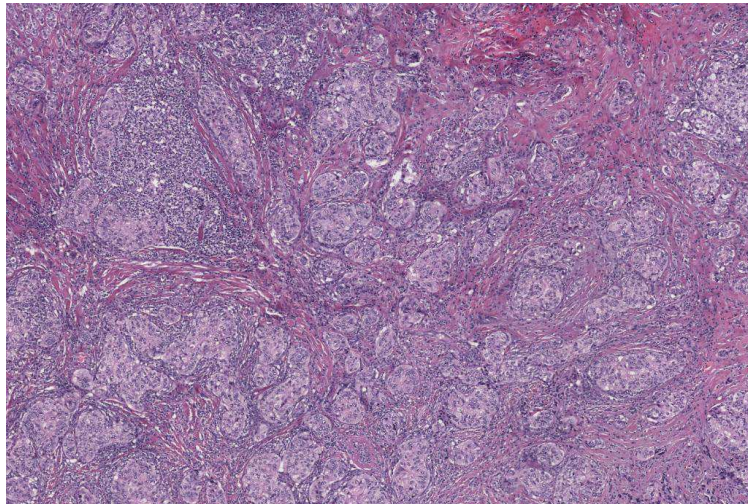


Figura 4. Imatge microscòpica d'un CINE. S'identifica creixement en nius sòlids.

Carcinoma lobel·lar infiltrant: carcinoma infiltrant format per cèl·lules no cohesives que es disposen normalment de manera individual adoptant un patró característic "en filera" en un estroma fibrós, i generalment associat amb la presència de carcinoma lobel·lar in situ.

Macroscòpicament poden ser tumors difícils d'identificar pel seu creixement difús, i s'identifiquen més fàcilment al tacte. Amés del patró histològic clàssic hi ha variants morfològiques: sòlida, alveolar, pleomòrfica (amb major atípia i índex mitòtic) o túbulo-lobel·lar. En la major part de casos coexisteixen diferents patrons. Una de les principals alteracions moleculars del CLI és la pèrdua d'expressió d'E-cadherina, una molècula d'adhesió cel·lular, que contribueix a la pèrdua de cohesió característica d'aquests tumors. Aquesta alteració es pot posar de manifest amb tècniques immunohistoquímiques (IHQ) ¹⁶.

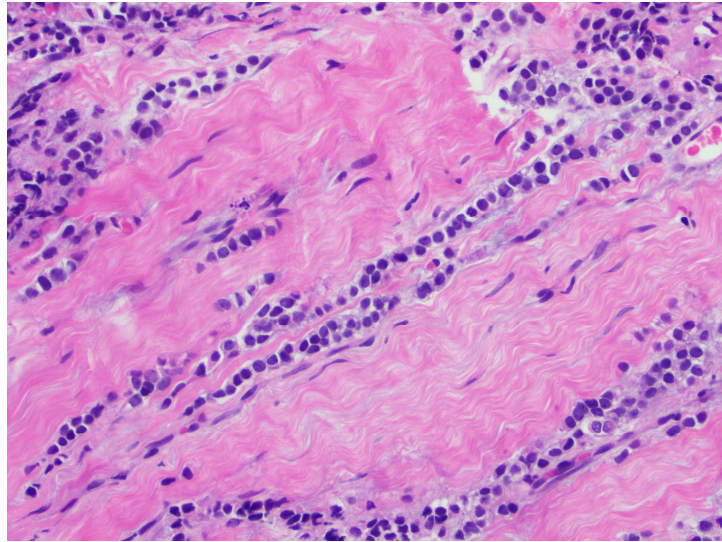


Figura 5. Imatge macroscòpica d'un CLI. Pareu atenció al patró característic "en filera".

5.- CLASSIFICACIÓ MOLECULAR DEL CÀNCER DE MAMA:

L'estudi del perfil genètic dels tumors de mama ha permès identificar subtipus específics de tumors malignes, incloent tumors luminals (A i B), tumors enriquits amb HER2 i tumors triple negatius (o basals). Aquests subtipus difereixen tant del punt de vista de la seva expressió gènica, característiques clíniques, resposta al tractament i pronòstic ¹⁸¹⁹.

Subtipus luminal: és el més freqüent. El seu nom deriva de la similitud existent amb l'expressió gènica de les cèl·lules epitelials luminals. Mostren expressió IHQ per citoqueratines 8 i 18, receptors d'estrògens (RE) i progesterona (RP). La separació entre luminal A i B es basa en la proporció de cèl·lules neoplàstiques que expressen RP ($\geq 20\%$ per a luminal A i $< 20\%$ per a luminal B) i l'índex proliferatiu Ki67 ($< 20\%$ en luminal A i $\geq 20\%$ en luminal B). Al seu torn, el grup luminal B es divideix en HER2 positiu o negatiu depenent de l'expressió o no d'aquest receptor.

Des del punt de vista clínic, representen aproximadament el 70% de tots els carcinomes de mama i responen al tractament antihormonal. La resposta a la quimioteràpia és variable i, en general, són de bon pronòstic ^{18 19}.

Sobreexpressió HER2: caracteritzada per la sobreexpressió IHC o amplificació de HER2 i la manca d'expressió IHC dels receptors hormonals (RE i RP). Clínicament representen al voltant del 15% dels tumors de mama malignes i solen ser d'alt grau histològic i tenen afectació axil·lar. Responen al tractament dirigit contra HER2 i quimioteràpia basada en l'antraciclina. Acostumen a tenir mal pronòstic ^{18 19}.

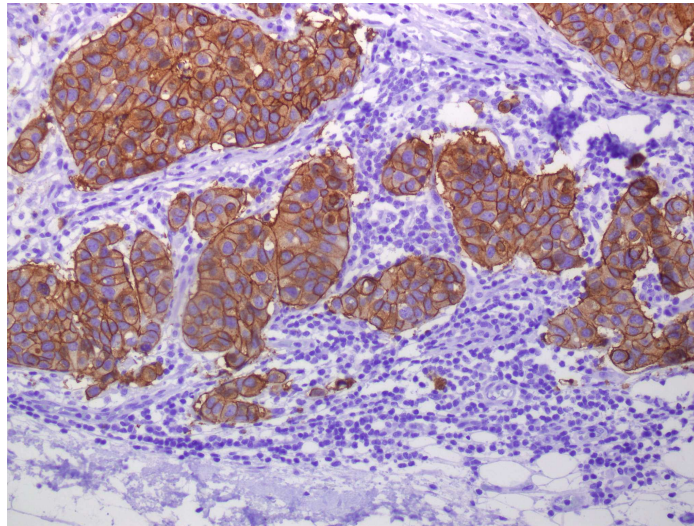


Figura 6. HER2 tumor positiu (IHC)

Tipus basal: el 80% dels tumors considerats triple negatius (RE, RP i HER2) són en realitat de tipus basal. Representen el 15% de les malalties malignes de la mama i habitualment tenen alteracions del gen *BRCA1*. No responen al tractament antihormonal, però són sensibles als tractaments basats en platí i inhibidors de la polimerasa poli ADP-ribosa (PARP). El seu pronòstic és dolent ¹⁸.

6.- ESTADIFICACIÓ DEL CÀNCER DE MAMA:

El sistema d'estadificació habitual és el TNM que publica l'*American Joint Committee on Cancer (AJCC)/Union for International Cancer Control (UICC)*. Té en compte l'abast del tumor primari (T), l'afectació de ganglis axil·lars regionals (N) i la presència de metàstasi a distància (M) ²⁰.

T, N i M es combinen per crear 5 estadis clínics (0, I, II, III i IV) que resumeixen l'extensió regional (mida tumoral, extensió a la pell o paret toràctica, afectació

axil·lar) i metàstasi a distància. Aquesta informació és important per a la presa de decisions, tant per a l'abordatge local com per a determinar la necessitat de tractament sistèmic. Les noves proves moleculars basades en plataformes d'expressió gènica (com Mammaprint®, OncotypeDX® o PAM50) poden completar aquesta informació estimant el risc de metàstasi, recaiguda o resposta al tractament ^{21 22}.

When T is...	And N is...	And M is...	Then the stage group is...
Tis	N0	M0	0
T1	N0	M0	IA
T0	N1mi	M0	IB
T1	N1mi	M0	IB
T0	N1	M0	IIA
T1	N1	M0	IIA
T2	N0	M0	IIA
T2	N1	M0	IIB
T3	N0	M0	IIB
T0	N2	M0	IIIA
T1	N2	M0	IIIA
T2	N2	M0	IIIA
T3	N1	M0	IIIA
T3	N2	M0	IIIA
T4	N0	M0	IIIB
T4	N1	M0	IIIB
T4	N2	M0	IIIB
Any T	N3	M0	IIIC
Any T	Any N	M1	IV

Figura 7. Estadis clínics segons els diferents paràmetres de TNM segons la AJCC (8^a edició) ²⁰

7.- ESTUDI DEL GANGLI SENTINELLA:

7.1.- Evolució dels mètodes d'anàlisi

El concepte de GS és basa en la premissa de que existeix una primera estació de drenatge limfàtic que prediu l'afectació de la resta de ganglis. Des del seu descobriment s'han anat perfeccionant tant les tècniques de detecció com les d'estudi del GS.

Inicialment l'anàlisi es feia sempre en diferit, després de fixar la mostra en formaldehid. Els primers estudis de Giuliano comparaven l'estudi rutinari de les

limfadenectomies amb hematoxilina-eosina (HE) amb l'estudi exhaustiu del GS amb talls seriats i IHQ i demostraren que aquest darrer grup detectava més metàstasis ²³. Observació que fou confirmada per altres autors ²⁴. Aquest anàlisi exhaustiu del GS no era possible si es volia fer l'estudi de manera intraoperatòria i evitar tornar a portar les pacients al quiròfan si l'empremta citològica i/o el tall en congelació no havien detectat les metàstasis i aquestes es trobaven a l'estudi post-fixació.

La publicació de la 6a edició del TNM al 2002 suposà encara un altre repte per al patòleg, doncs introduí el terme "micrometàstasi" definit com "afectació del gangli axil·lar de <2mm però >0,2 mm" (les de >2mm eren "macrometàstasis" i les de <0,2 mm "cèl·lules tumorals aïllades"). La manera de mesurar les metàstasis no és gens clara i trobem diferents definicions en la literatura ²⁵²⁶. De mica en mica es va veure clar que l'anàlisi intraoperatori del GS per congelació era una eina suficient per identificar macrometàstasis, però un gran nombre de micrometàstasis s'identificaven a l'estudi post-fixació on la qualitat de l'HE és major, es poden fer més talls i IHQ.

Per tal d'abordar aquest reptes s'elaboraren diferents guies i protocols ²⁶²⁷ per l'estudi del GS però hi existia gran variabilitat en la pràctica als diferents serveis d'anatomia patològica ²⁸.

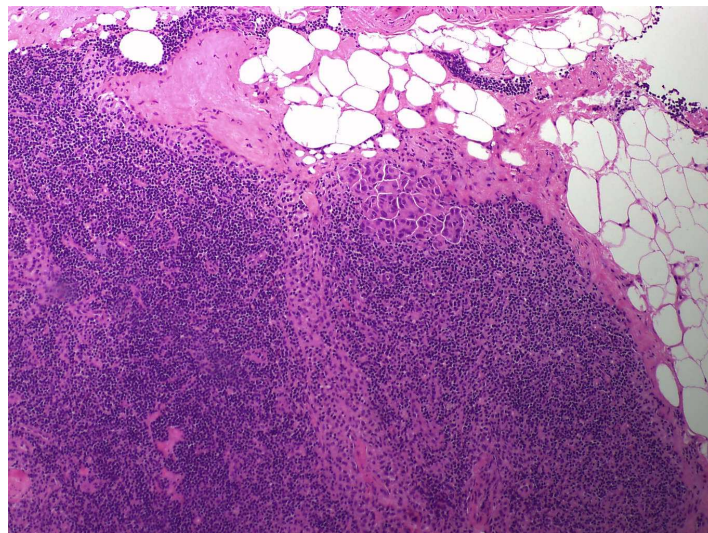


Figura 9. Micrometàstasi ganglionar de carcinoma

La incorporació de tècniques de biologia molecular en el camp de l'anatomia patològica es va intentar aplicar a l'anàlisi del GS però, un cop més, la necessitat de fer-ho de manera intraoperatòria i la impossibilitat de quantificar la mida de les metàstasis no va permetre la seva incorporació a la rutina diagnòstica.

Diferents tecnologies intentaren solucionar aquest problemes. El Breast Lymph Node Assay (BLNA), de Veridex® analitzava la meitat de la mostra per reacció en cadena de polimerasa amb transcriptasa inversa (RT-PCR) amb molt bona concordança amb la histologia ²⁹ però la meitat del gangli continuava analitzant-se en diferit.

Quasi al mateix temps, Sysmex® va presentar un altre mètode d'anàlisi intraoperatòri (One Step Nucleic acid Amplification - OSNA® -) que mostrava una gran diferència amb els mètodes moleculars descrits anteriorment, i introduïa una nova tècnica (la RT-LAMP) per a la valoració quantitativa de l'àcid ribonucleic missatger (RNAm) de citoqueratina 19 (CK19). Aquest mètode te una sèrie d'avantatges sobre l'RT-PCR, ja que és isotèrmic, és més ràpid, no requereix purificació de l'RNA i mostra una major especificitat quan s'utilitzen 6 primers específics. D'altra banda, ha introduït una novetat molt important, doncs ha permès l'estudi de tota la mostra intraoperatòriament en uns 30-35 minuts, sense reservar material per a l'estudi convencional en diferit.



Figura 10. Processament del GS per OSNA i aparell RD-210.

Diversos estudis han comprovat l'elevada sensibilitat i especificitat d'aquesta tècnica. Els primers estudis de validació publicats per Tsujimoto et al en 2007 van estudiar 325 ganglis, obtenint una concordança del 98,2% i cap fals positiu ³⁰. Visser et al, un any després, van realitzar un estudi similar amb 346 ganglis de 32 pacients obtenint una concordança de 96,8%, sensibilitat del 95,3% i especificitat del 97,1% ³¹. Schem, el 2009, va trobar una concordança del 91,8%, una sensibilitat del 98,1% i una especificitat del 90,8% en una anàlisi de 343 ganglis ³². Feldman va publicar la sèrie més gran (1044 GS de 496 pacients) obtenint una sensibilitat del 82,7% i especificitat del 97,7% ³³.

L'estudi per OSNA® ha permès el diagnòstic automàtic, reproduïble i definitiu de tot el GS.

7.2.- Processament del GS per OSNA

El processament de la mostra per OSNA difereix completament del mètode convencional. En rebre la mostra, el primer que cal fer és eliminar el teixit adipós periganglionar, ja que dificulta processar el gangli. Aquest es mesura, pesa i secciona longitudinalment. És el moment de fer una empremta citològica de la superfície de tall per tenir una mostra per fer correlació morfològica. El gangli s'homogeneïtza en la seva totalitat, utilitzant 4 ml de la solució tampó de lisi (Lynorhag- Sysmex Corporation, Kobe, Japó), amb posterior centrifugació a 10.000 r.p.m. El gangli es divideix en el nombre de fragments necessaris perquè cap d'ells superi els 650 mg o sigui inferior a 50 mg. Un total de 2µL de sobrenedant s'introdueixen en l'analitzador RD-210 (Sysmex), un sistema automatitzat de detecció d'amplificació gènica molecular, que utilitza la tecnologia RT-LAMP i el kit LynoampBC (Sysmex). La mesura del producte amplificat es durà a terme mitjançant turbidimetria, per reacció amb pirofosfat de magnesi, obtenint una quantificació indirecta, en temps real, del nombre de còpies RNAm de CK19 obtingudes. L'anàlisi sempre inclourà un control positiu estàndard i el control negatiu per a la validació de cada prova.

Depenent del nombre de còpies de RNAm de CK19/µL, i segons uns punts de tall establert per a la tècnica, definim:

- Macrometàstasi (++): $> 5 \times 10^3$ còpies/ μ L d'RNAm CK19.
- Micrometàstasi (+): $2,5 \times 10^2 - 5 \times 10^3$ còpies/ μ L de RNAm CK19.
- Absència de metàstasis (-): $< 2,5 \times 10^2$ còpies/ μ L de RNAm CK19.

L'ús de l'OSNA com a mètode d'elecció per l'anàlisi del GS s'ha estès a Espanya i a Europa.

8.- ESTUDI DE LA LIMFADENECTOMIA:

L'examen histològic d'una secció de gangli segueix sent el principal mètode per a la identificació de metàstasis als ganglis no sentinella (GNS). Les guies més recents recomanen que els espècimens es divideixin fent talls de no més de 2 mm de gruix per augmentar la probabilitat de detectar totes les macrometàstasis ²⁵. No obstant això, molts departaments d'anatomia patològica continuen analitzant només una única secció pels GNS (un nivell del gangli obert longitudinalment), que es reconeix en algunes guies com el mètode estàndard mínim ²⁶. A més, com al GS, no està clar quin és el millor mètode per mesurar metàstasis ^{25,26}. Una alternativa a l'avaluació histològica de les metàstasis dels GNS és l'ús de tècniques moleculars tal i com es fa amb els GS, així malgrat el cost i l'esforç afegit, l'anàlisi seria estàndard i es detectarien totes les metàstasis.

L'estadi dels ganglis axil·lars (pN) es considera un dels principals factors pronòstics en pacients amb càncer de mama. Durant molt de temps s'ha sabut que existeix una relació directa entre el nombre de ganglis positius i la supervivència ^{34,35}.

La LA és el millor mètode per avaluar el pN però és un procediment quirúrgic no exempt de morbiditat i en el 40-60 % dels casos el GS és l'únic gangli positiu ^{36,37}. Tot i que, com hem comentat, l'estudi dels GNS no es tan exhaustiu com els dels GS així que existeix la possibilitat de que hi hagi metàstasis no detectades.

En qualsevol cas les disseccions axil·lars han vingut perdent popularitat des de la publicació de l'assaig ACOSOG Z0011 ¹⁴. En aquest estudi, Giuliano et al. van trobar que la LA no millorava el pronòstic en un grup seleccionat de pacients amb GS positiu, considerant-la per tant innecessària.

Amb la disminució del nombre de limfadenectomies es fa necessari trobar estimacions alternatives del pN que serveixin per estadificar i planificar el

tractament.

9.- CONCEPTE DE CÀRREGA TUMORAL TOTAL:

Està universalment acceptat que amb GS negatiu no cal fer LA ³⁸. Com hem comentat, quan el GS és positiu el risc de tenir més afectació axil·lar varia d'uns estudis a altres ³⁶³⁷. L'assaig ACOSOG Z0011 però, va demostrar que en un grup seleccionat de pacients aquest risc és menor (27 %) i per tant aquestes pacients podrien estalviar-se la LA tot i tenir el GS positiu ¹⁴. Per tal de predir l'afectació en totes les pacients (també les que no compleixin els criteris del Z0011), s'han anat proposat models predictius d'afectació axil·lar ³⁹⁴⁰⁴¹ que inclouen diferents variables: mida, histologia, grau, permeació limfovascular, receptors hormonals amb major i menor impacte. Sembla clar que la mida de les metàstasis és un factor important a tenir en compte ⁴²⁴³. Aquests models tenen en comú que l'anàlisi del GS es fa per histopatologia i donada la diversitat en els protocols d'estudi d'aquest ²⁸ i la manca d'estandardització en la manera de mesurar les metàstasis, aquests paràmetres son susceptibles de variabilitat interobservador ⁴⁴

La introducció del mètode OSNA a l'estudi del GS va suposar un canvi en el mètode per detectar metàstasis (de l'histologia al molecular), en la manera de mesurar les metàstasis (de mm a nombre de còpies) i va fer possible un estudi automatitzat i reproduïble tant de la positivitat com del tipus de metàstasi (macro/micro).

Amés d'aquests resultats "qualitatius" proporciona un valor numèric: la càrrega tumoral total (TTL) que es defineix com el sumatori de còpies de RNAm de CK19/ μ L obtinguda amb OSNA ⁴⁵. Aquesta nova eina ha demostrat en múltiples estudis el seu valor predictiu per identificar pacients que, tot i tenir afectació del GS, tenen un risc molt baix de presentar metàstasis en els GNS⁴⁵⁴⁶⁴⁷⁴⁸ i ha esdevingut un factor addicional que incorporar als nomogrames predictius ⁴⁹⁵⁰. Aquests resultats han fet que la TTL s'incorpori a algunes guies clíniques nacionals ⁵¹⁵².

HIPÒTESIS

Hipotesi

Aquesta tesi es planteja d'acord amb les següents hipòtesis:

- 1) L'afectació axil·lar (pN) és un factor pronòstic molt important en càncer de mama, però el seu estudi en la LA no és tan exhaustiu com en el GS.
- 2) L'anàlisi dels ganglis mitjançant OSNA permet un estudi automatitzat amb criteris de positivitat estàndard i reproduïbles també pels GNS.
- 3) L'anàlisi molecular amb OSNA dels ganglis limfàtics permet la valoració de tot el teixit posant de manifest possibles metàstasis ocultes que podrien modificar l'estadi final de la pacient.
- 4) El canvi d'estadi pot variar el pronòstic de les pacients.
- 5) TTL és una estimació de pN pel que pot tenir valor pronòstic i aportar la informació que hem perdut en aquelles pacients amb GS positiu en què no es realitza LA i, per tant, el pN es basa exclusivament en l'estudi del GS (pN(sn)).
- 6) Tal i com l'estudi del GS ha aportat la TTL, l'estudi dels GNS pot proporcionar noves variables amb implicació pronòstica: la càrrega tumoral als GNS (AD-TTL) i la càrrega tumoral a tots els ganglis (G-TTL).

OBJECTIUS

Objectius

1.- Objectius primaris:

- 1) Comparar l'estadificació per histopatologia i l'estadificació molecular mitjançant OSNA per tal de comprovar si existeixen diferències
- 2) Comprovar si l'estadificació molecular mitjançant OSNA suposa un augment en el pN
- 3) Comprovar si l'estadificació molecular mitjançant OSNA modifica el pronòstic de les pacients
- 4) Estudiar el valor pronòstic de TTL al GS

2.- Objectius secundaris:

- 1) Estudiar el valor pronòstic d'AD-TTL i G-TTL
- 2) Comprovar si TTL prediu afectació axil·lar quan s'analitzen els GNS amb OSNA (la mateixa metodologia emprada pel GS)

**PUBLICACIONS:
MÈTODES I RESULTATS**

1.- METODOLOGIA DEL PROJECTE D'INVESTIGACIÓ:

El disseny de l'estudi, la població i la metodologia emprada en el mateix queden descrits en els apartats "Material i mètodes" de cadascun dels articles que componen aquesta tesi doctoral.

Les referències i *abstracts* d'aquests articles estan inclosos en las pàgines següents .

2.- TREBALL REALITZAT: PUBLICACIONS

2.1.- Estudi 1:

“Axillary staging based on molecular analysis: Results of the B-CLOSER-II study”

Sansano, I., Vieites, B., Sancho de Salas, M., García, C., Amendoeira, I., Bernet, L., Pérez-García, J. M., Espinosa-Bravo, M., Rubio, I. T., Ramón y Cajal, S., & Peg, V

Pathology Research and Practice. 2020; 216 (11).

<https://doi.org/10.1016/j.prp.2020.153197>

Abstract:

Introduction: Axillary staging (pN) is a strong predictor of outcome in early stage breast cancer yet following the publication of the Z0011 trial there has been an increasing tendency to spare lymph node dissection. Automated molecular detection of cytokeratin 19mRNA by one-step nucleic acid amplification (OSNA) has been demonstrated to be an accurate method to assess sentinel lymph node (SLN) metastasis. In this study we compare histological and molecular methods following complete axillary lymph node dissection (cALND), determine whether molecular axillary staging affects survival, and evaluate the predictive and prognostic value of total tumor load in ALND (AD-TTL) and in all positive nodes (G-TTL). *Material and methods:* Axillary lymph nodes were collected from 102 patients with primary breast cancer with histological confirmation of axillary involvement (cN+) or positive SLN. The central 1-mm portion of each non- SLN was processed for hematoxylin-eosin staining and the remaining tissue was analyzed by OSNA. *Results:* Non-SLNs were diagnosed as positive in 72 out of 102 patients (70.6 %) on OSNA compared with only 53 (52 %) on histology ($p < 0.01$). Thirteen patients would have changed staging if the diagnoses provided had been by molecular methods ($p < 0.01$), but without a change in prognosis. AD-TTL and G-TTL were predictive of recurrence and mortality. *Conclusions:* Compared to molecular detection, histological examination significantly underestimates the frequency of axillary node metastases. However, the increase in pN did not show a clinical effect on survival in those patients.

2.2.- Estudi 2:

“Role of total tumour load of sentinel lymph node on survival in early breast cancer patients”

Peg, V., Sansano, I., Vieites, B., Bernet, L., Cano, R., Córdoba, A., Sancho, M., Martín, M. D., Vilardell, F., Cazorla, A., Espinosa-Bravo, M., Pérez-García, J. M., Cortés, J., Rubio, I. T., & Ramón y Cajal, S.

The Breast. 2017; 33, 8–13.

<https://doi.org/10.1016/j.breast.2017.02.011>

Abstract:

Background: Axillary staging (pN) is considered one of the most important prognostic factors in breast cancer patients. However, the Z0011 study data drastically reduced the number of surgical axillary dissections in a selected group of patients, limiting the prognostic information relating to axillary involvement to the sentinel lymph node (SLN). It is known that there is a relationship between SLN total tumour load (TTL) and axillary involvement. The objective of this study is to analyse the relationship between the TTL and outcomes in patients with early stage breast cancer. *Patients and methods:* clinicopathological and follow-up data were collected from 950 patients with breast cancer between 2009 and 2010 on whom SLN analysis was conducted by molecular methods (One Step Nucleic Acid Amplification, Sysmex, Kobe, Japan). *Results:* TTL (defined as the total number of CK19 mRNA copies in all positive SLN) correlates with p $\frac{1}{4}$ 0.0014) and overall survival (HR: 1.08, p $\frac{1}{4}$ 0.0032), clearly defining a low-risk group (TTL <2.5 ? 104 disease free survival (HR, 1.08; p $\frac{1}{4}$ 0.000004), with local recurrence disease free survival (HR $\frac{1}{4}$ 1.07; CK19 mRNA copies/mL) versus a high-risk group (>2.5 ? 104 CK 19 mRNA copies/mL). *Conclusions:* SLN TTL permits the differentiation between two patient groups in terms of DFS and OS, independently of axillary staging (pN), age and tumour characteristics (size, grade, lymphovascular invasion). This new data confirms the clinical value of low axillary involvement and could partially replace the information that staging of the entire axilla provides in patients on whom no axillary lymph node dissection is performed.

DISCUSSIÓ

Discussió

En el càncer de mama, com a la resta de tumors, els factors pronòstics proporcionen informació sobre el curs de la malaltia i classifiquen els pacients per tal de rebre un millor tractament. La constant evolució de l'abordatge terapèutic obliga els patòlegs a adaptar la determinació d'aquest factors o inclús a buscar-ne de nous. L'estadificació axil·lar del càncer de mama n'és un exemple paradigmàtic.

L'estadificació axil·lar s'ha considerat sempre com un dels principals marcadors predictius del càncer de mama en estadi inicial, amb clares diferències entre aquelles pacients sense afectació ganglionar (pN0), amb un a tres ganglis (pN1), amb quatre a nou ganglis (pN2) i amb més de deu ganglis (pN3) ³⁴³⁵. No obstant això, des de la introducció del GS, no totes les pacients s'han de sotmetre a LA radical. És per això que el patòleg ha de parar especial atenció a l'estudi d'aquesta mostra fent una revisió minuciosa de diferents seccions histològiques amb o sense IHC. En la resta de ganglis, els GNS, l'estudi es redueix a un tall central i tinció amb HE a molts centres ²⁸.

El mètode OSNA és un anàlisi automatitzat, reproduïble i definitiu del gangli, doncs analitza la totalitat del teixit i és la tècnica escollida per l'estudi del GS en alguns hospitals. L'estudi dels GNS no acostuma a ser tan exhaustiu com al GS en cap servei d'anatomia patològica i no obstant es parla d'aixelles negatives amb GS positius ³⁶³⁷¹⁴.

Per tal de comprovar si existeixen diferències entre l'anàlisi convencional i molecular dels GNS vam dissenyar el primer dels treballs que componen aquesta tesi⁵³ Es tracta d'un estudi multicèntric on 5 hospitals van rebre i processar les limfadenectomies de 102 pacients en paral·lel de les dues maneres. Des del nostre servei vam recollir totes les dades clinicopatològiques en una base i vam poder comparar-les. Els metges a càrrec del tractament només van ser informats del resultat histopatològic. Calgué esperar uns anys per obtenir les dades de seguiment.

Aplicant la tecnologia OSNA a l'estudi de tota la LA vam comprovar que els mètodes convencionals infraestimen la quantitat de tumor a l'aixel·la (52% per histologia i 71% per OSNA) com ja havien observat altres autors ⁵⁴⁵⁵. Aquesta

Discussió

troballa posa en dubte les elevades taxes d'aixelles negatives reportades amb GS positius³⁶³⁷¹⁴.

L'anàlisi molecular va detectar 17 macrometàstasis més que l'histològic i 60 micrometàstasis més. Tots els casos discordants foren revisats tornant a mirar l'HE i fent un reanàlisi del material excedent de l'homogeneïtzat dels ganglis. En tots els casos es va obtenir el mateix resultat. L'explicació a les discrepàncies diagnòstiques en favor de l'OSNA està en el teixit que l'estudi histològic no va analitzar (les metàstasis que no estaven en la llesca central del gangli). Vam triar deliberadament aquest enfocament per reflectir el mètode estàndard mínim utilitzat en molts serveis de patologia²⁸ i així destacar fins a quin punt la malaltia metastàtica pot ser subestimada. Les guies més recents recomanen almenys una secció cada 2 a 3 mm²⁶. L'objectiu d'aquestes indicacions és detectar totes les macrometàstasis però és possible que algunes micrometàstasis quedin sense identificar malgrat la feina afegida.

Tot i l'evident major sensibilitat diagnòstica de l'OSNA, en 3 dels 1471 ganglis estudiats la discrepància va ser en favor de la histologia, això s'explica per una limitació en el disseny de l'estudi doncs la llesca central no va poder ser analitzada per OSNA i es va reservar per l'estudi histològic.

Les pacients amb metàstasis "ocultes" per a la histologia no van tenir però un pitjor pronòstic. Aquesta troballa està en consonància amb el que ja s'havia publicat sobre metàstasis ocultes als GS⁵⁶ però s'havia posat en dubte en els GNS⁵⁷⁵⁸.

El fet de detectar més ganglis positius implica que un nombre significatiu de pacients (13%) haguessin tingut un estadi pN superior si l'estadificació en la pràctica habitual es fes amb l'OSNA. Aquestes pacients no mostraven cap característica epidemiològica o histològica diferencial i no van demostrar un pitjor pronòstic que les que no canviaven d'estadi. A la nostra sèrie tant l'estadi per histologia com l'estadi per OSNA predeien la recidiva i l'èxitus de manera molt similar.

Aquesta observació és de gran rellevància doncs un estadi major podria haver suposat un tractament més agressiu sense ser necessari. Donada la tendència

Discussió

actual a evitar la LA, la gran sensibilitat de l'OSNA podria considerar-se un problema però estudis recents demostren que si es segueixen les guies, la detecció de metàstasis ocultes no porta a un major nombre de limfadenectomies ni a més tractament adjuvant ⁵⁹.

Des de la publicació dels resultats de l'estudi ACOSOG Z0011, que va demostrar que la LA no proporciona cap benefici en termes de supervivència en un subgrup de pacients amb 1-2 GS positius, el nombre de LA ha disminuït dràsticament ⁶⁰. Això implica que, en aquest grup de pacients, l'estadificació axil·lar, un dels principals factors pronòstics en càncer de mama ³⁴³⁵ es limita únicament a l'estudi del GS (pN(sn)) no podent tenir l'autèntic estadi pN.

Diversos estudis han observat que la TTL és un potent predictor de més malaltia a l'aixella ⁴⁵⁴⁶⁵⁰⁴⁹ i és per tant una estimació de pN. Amb voluntat d'esclarir si és amés un factor pronòstic vam dissenyar el segon treball que conforma aquesta tesi⁶¹. Per tal de tenir un nombre suficient de pacients vam demanar la col·laboració d'altres 14 hospitals que fan servir l'OSNA per analitzar el GS i així vam aconseguir recollir les variables necessàries en una sèrie de 950 pacients. Agrupant la TTL per quartils vam identificar dos grups de pacients un amb alt risc de recidiva (TTL \geq 25000 còpies de RNAm de CK19/ μ L) i un altre de baix risc (TTL $<$ 25000 còpies de RNAm de CK19/ μ L). Així vam poder comprovar l'habilitat de TTL per predir la supervivència lliure de malaltia a 5 anys, la supervivència lliure de malaltia loco-regional i la supervivència global. Aquesta capacitat no es veu afectada per les característiques de les pacients, del tumor ni pels efectes del tractament.

Al primer treball amés vam confirmar aquesta capacitat de TTL de dir si hi ha més ganglis positius a l'aixella, per primera vegada analitzant tots els ganglis amb la mateixa tècnica. En aquesta sèrie però, tot hi que les pacients amb recidives tenien una TTL més elevada, aquesta diferència no va assolir significació estadística, possiblement per que aquest treball te una n més modesta i l'estudi no es va dissenyar amb aquest propòsit.

L'anàlisi molecular de tota la LA ha proporcionat dues noves variables numèriques: AD-TTL (TTL als GNS) i G-TTL (TTL a tots els ganglis). Ambdós han

Discussió

demonstrat la seva capacitat per predir recidives i mortalitat inclús major que la del pN. Això confirma la importància de la càrrega tumoral a l'aixel·la en el pronòstic de les pacients i subratlla el valor potencial de TTL en el maneig terapèutic.

TTL és una manera objectiva de diagnosticar les metàstasis al GS que ens aporta una variable numèrica, més informativa que un resultat qualitatiu, que pot ser emprada alhora de dissenyar el tractament de les pacients tal i com proposen alguns treballs ⁶²⁶³, sobretot en aquelles pacients que no compleixen els criteris del Z0011.

El valor real d'aquesta eina s'hauria de confirmar en assaigs prospectius així com explorar la seva validesa en altres situacions clíniques com la neoadjuvència on l'ús de l'OSNA és controvertit⁶⁴⁶⁵.

Les publicacions que componen aquesta tesi són part d'una línia d'investigació sobre metàstasis ganglionars que es va iniciar al nostre servei al 2008 amb la introducció de l'OSNA en Espanya, i que ha donat lloc a diferents publicacions ⁴⁵⁴⁶⁵⁰⁶⁶, algunes d'elles amb resultats que s'han incorporat a guies clíniques nacionals⁵¹⁵². Aquesta línia d'investigació, s'ha fet extensiva a tumors d'altres òrgans com: tiroides, cèrvix, colon, endometri i pròstata⁶⁷⁶⁸. Els diferents treballs tenen enfocaments variats però en general tots tracten de desenvolupar la tècnica del GS i /o revisar l'estadificació, sempre fent servir la capacitat de l'OSNA per detectar de manera automatitzada i reproduïble tota la malaltia als ganglis. Altres grups s'han interessat també pel potencial pronòstic de TTL com són els treballs publicats en càncer colo-rectal ⁶⁹.

Altres tipus de tumors, com el càncer de pulmó, plantegen dificultats tècniques, com són: l'existència controvertida d'un GS⁷⁰, la dificultat per individualitzar els ganglis o la de fer una llesca central per donar un diagnòstic histopatològic alhora del molecular. De superar-se aquests entrebancs resultarien estadificacions molt interessants de replantejar.

Finalment deixem oberta una darrera reflexió sobre la importància de definir i caracteritzar el tipus de cel·lularitat neoplàstica de les metàstasis. Així com ha succeït en la darrera edició de l'estadificació TNM de l'AJCC²⁰, on les

Discussió

característiques “biològiques” del tumor s’han incorporat a la mateixa, modificant l’estadi clínic final, caldria determinar si totes les metàstasis “moleculares” tenen el mateix valor. Pensem que podria aprofitar-se l’mRNA obtingut de l’homogeneïtzació dels ganglis per determinar algun marcador addicional que pugui afegir informació sobre la biologia del càncer i no quedar-nos només en quantificar la quantitat de tumor present.

CONCLUSIONS

Conclusions

- 1) L'estudi histopatològic convencional no diagnostica totes les metàstasis presents als ganglis limfàtics de l'aixella. S'escapen sobretot micrometàstasis.
- 2) Aquest major nombre de metàstasis detectades suposa un canvi en l'estadi (pN) de les pacients.
- 3) L'augment d'estadi axil·lar (pN) no comporta un pitjor pronòstic per les pacients.
- 4) La TTL al GS és capaç de classificar les pacients en aquelles que tenen alt i baix risc de recidiva i és per tant un factor pronòstic a tenir en compte sobretot en aquelles pacients en les que no es fa LA.
- 5) La càrrega tumoral al GS (TTL) és un valor objectiu i reproduïble que estudia els ganglis per complet, indicant el risc de més metàstasi als GNS, també quan aquests s'estudien per OSNA.
- 6) Els valors de càrrega tumoral als GNS (AD-TTL) i a tota l'aixella (G-TTL) són predictors de recidiva i mortalitat.

BIBLIOGRAFIA

1. Lukong, K. E. Understanding breast cancer – The long and winding road. *BBA Clin.* **7**, 64–77 (2017).
2. Brawanski, A. On the myth of the Edwin Smith papyrus: Is it magic or science? *Acta Neurochir. (Wien)*. **154**, 2285–2291 (2012).
3. Rayter, Z. History of breast cancer therapy. in *Medical Therapy of Breast Cancer* 1–36 (Cambridge University Press, 2003).
doi:10.1017/CBO9780511545870.001
4. de Moulin, D. *A short history of breast cancer*. (Springer, 1989).
5. Papavramidou, N., Papavramidis, T. & Demetriou, T. Ancient greek and greco-Roman methods in modern surgical treatment of cancer. *Ann. Surg. Oncol.* **17**, 665–667 (2010).
6. Galen. *Clavdii Galeni Opera omnia. Editionem curavit d. Carolvs Gottlob Kühn*
7. Chikly, B. Who discovered the lymphatic system. *Lymphology* **30**, 186–93 (1997).
8. LF Haas. Franciscus de le Boe or Sylvius 1614-72. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **55**, 727 (1992).
9. Moore, W. *The Knife Man: The Extraordinary Life and Times of John Hunter, Father of Modern Surgery*. (2006).
10. Le Dran, F. *Memoire avec une précis de plusieurs observations sur le cancer*. (1757).
11. Donegan, W. L. *History of Breast Cancer*. (2006).
12. Boyd, S. On oophorectomy in the treatment of cancer. *Br. Med. J.* (1897).
13. Gould, E. A., Winship, T., Philbin, P. H. & Kerr, H. H. Observations on a “sentinel node” in cancer of the parotid. *Cancer* **13**, 77–78 (1960).
14. Giuliano, A. E. *et al.* Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis: a randomized clinical trial. *JAMA* **305**, 569–75 (2011).

15. GLOBOCAN - World Health Organization (WHO). Estimated number of deaths in 2020, worldwide, females, all ages. *Global Cancer Observatory* (2020).
16. *The World Health Organization (WHO) Classification of Breast Tumours*. (2019).
17. Esserman, L. J. *et al.* Impact of mammographic screening on the detection of good and poor prognosis breast cancers. *Breast Cancer Res. Treat.* **130**, 725–734 (2011).
18. Perou, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747–752 (2000).
19. Sørliie, T. *et al.* Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 8418–8423 (2003).
20. Amin MB, Edge S, Greene F, Byrd DR, Brookland RK, W. M. *AJCC Cancer Staging Manual*. (Springer International Publishing, 2017).
21. Sparano, J. A. *et al.* Adjuvant Chemotherapy Guided by a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **379**, 111–121 (2018).
22. Cardoso, F., van't Veer, L., J. Bogaerts, L. Slaets, G. Viale, S. Delaloge, J.-Y. Pierga, E. Brain, S. C. & M. DeLorenzi, A.M. Glas, V. Golfinopoulos, T. Goulioti, S. Knox, E. Matos, B. Meulemans, P.A. Neijenhuis, U. Nitz, R. Passalacqua, P. Ravdin, I.T. Rubio, M. Saghatchian, T.J. Smilde, C. Sotiriou, L. Stork, C. Straehle, G. Thomas, A.M. Thompson, J.M. van d, for the M. I. 70-Gene Signature as an Aid to Treatment Decisions in Early-Stage Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **375**, 717–729 (2016).
23. Giuliano, A. E. *et al.* Improved axillary staging of breast cancer with sentinel lymphadenectomy. *Ann. Surg.* **222**, 394–401 (1995).
24. Schreiber, R. H. *et al.* Microstaging of breast cancer patients using cytokeratin staining of the sentinel lymph node. *Ann. Surg. Oncol.* **6**, 95–101 (1999).

25. Wedemeyer, G. Protocol for the examination of specimens From patients with invasive carcinoma of the breast. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **134**, 505 (2010).
26. NHS Cancer Screening Programmes. Pathology reporting of breast disease in surgical excision specimens incorporating the dataset for histological reporting of breast cancer. *The Royal College of Pathologists* (2016).
27. Lyman, G. H. *et al.* American Society of Clinical Oncology guideline recommendations for sentinel lymph node biopsy in early-stage breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **23**, 7703–7720 (2005).
28. Cserni, G. *et al.* Discrepancies in current practice of pathological evaluation of sentinel lymph nodes in breast cancer. Results of a questionnaire based survey by the European Working Group for Breast Screening Pathology. *J. Clin. Pathol.* **57**, 695–701 (2004).
29. Blumencranz, P. *et al.* Sentinel node staging for breast cancer: intraoperative molecular pathology overcomes conventional histologic sampling errors. *Am. J. Surg.* **194**, 426–432 (2007).
30. Tsujimoto, M. *et al.* One-step nucleic acid amplification for intraoperative detection of lymph node metastasis in breast cancer patients. *Clin. Cancer Res.* **13**, 4807–4816 (2007).
31. Visser, M. *et al.* Intra-operative rapid diagnostic method based on CK19 mRNA expression for the detection of lymph node metastases in breast cancer. *Int. J. Cancer* **122**, 2562–2567 (2008).
32. Schem, C. *et al.* One-step nucleic acid amplification-a molecular method for the detection of lymph node metastases in breast cancer patients; results of the German study group. *Virchows Arch.* **454**, 203–10 (2009).
33. Feldman, S. *et al.* A novel automated assay for the rapid identification of metastatic breast carcinoma in sentinel lymph nodes. *Cancer* **117**, 2599–607 (2011).
34. Fisher, B. *et al.* Relation of number of positive axillary nodes to the

- prognosis of patients with primary breast cancer. An NSABP update. *Cancer* **52**, 1551–1557 (1983).
35. Carter, C. L., Allen, C. & Henson, D. E. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* **63**, 181–187 (1989).
 36. Chu, K. U. *et al.* Do all patients with sentinel node metastasis from breast carcinoma need complete axillary node dissection? *Ann. Surg.* **229**, 536–541 (1999).
 37. Reynolds, C. *et al.* Sentinel lymph node biopsy with metastasis: can axillary dissection be avoided in some patients with breast cancer? *J. Clin. Oncol.* **17**, 1720–6 (1999).
 38. Krag, D. N. *et al.* Sentinel-lymph-node resection compared with conventional axillary-lymph-node dissection in clinically node-negative patients with breast cancer: overall survival findings from the NSABP B-32 randomised phase 3 trial. *Lancet. Oncol.* **11**, 927–33 (2010).
 39. Degnim, A. C. *et al.* Clinicopathologic features of metastasis in nonsentinel lymph nodes of breast carcinoma patients. *Cancer* **98**, 2307–2315 (2003).
 40. Kohrt, H. E. *et al.* New models and online calculator for predicting non-sentinel lymph node status in sentinel lymph node positive breast cancer patients. *BMC Cancer* **8**, 66 (2008).
 41. Mittendorf, E. A. *et al.* Incorporation of sentinel lymph node metastasis size into a nomogram predicting nonsentinel lymph node involvement in breast cancer patients with a positive sentinel lymph node. *Ann. Surg.* **255**, 109–15 (2012).
 42. Bolster, M. J. *et al.* Risk factors for non-sentinel lymph node metastases in patients with breast cancer. The outcome of a multi-institutional study. *Ann. Surg. Oncol.* **14**, 181–189 (2007).
 43. Ozmen, V. *et al.* Factors predicting the sentinel and non-sentinel lymph node metastases in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **95**, 1–6 (2006).

44. Patani, N. & Mokbel, K. The clinical significance of sentinel lymph node micrometastasis in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **114**, 393–402 (2009).
45. Peg, V. *et al.* Intraoperative molecular analysis of total tumor load in sentinel lymph node: A new predictor of axillary status in early breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* **139**, 87–93 (2013).
46. Espinosa-Bravo, M. *et al.* Prediction of non-sentinel lymph node metastasis in early breast cancer by assessing total tumoral load in the sentinel lymph node by molecular assay. *Eur. J. Surg. Oncol.* **39**, 766–73 (2013).
47. Kubota, M. *et al.* One-step nucleic acid amplification assay for intraoperative prediction of advanced axillary lymph node metastases in breast cancer patients with sentinel lymph node metastasis. *Mol. Clin. Oncol.* **4**, 173–178 (2016).
48. Deambrogio, C. *et al.* A new clinical cut-off of cytokeratin 19 mRNA copy number in sentinel lymph node better identifies patients eligible for axillary lymph node dissection in breast cancer. *J. Clin. Pathol.* **67**, 702–6 (2014).
49. Piñero-Madrona, A. *et al.* External validation of a prognostic model based on total tumor load of sentinel lymph node for early breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* **181**, 339–345 (2020).
50. Rubio, I. T. *et al.* Nomogram including the total tumoral load in the sentinel nodes assessed by one-step nucleic acid amplification as a new factor for predicting nonsentinel lymph node metastasis in breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* **147**, 371–80 (2014).
51. Bernet, L. *et al.* Consenso sobre la biopsia selectiva del ganglio centinela en el cáncer de mama. Revisión 2013 de la Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria. *Rev. Española Patol.* **47**, 22–32 (2014).
52. SEGO *et al.* Oncoguía SEGO. Cáncer infiltrante de mama 2017. (2017).
53. Sansano, I. *et al.* Axillary staging based on molecular analysis: Results of

- the B-CLOSER-II study. *Pathol. Res. Pract.* **216**, (2020).
54. Vegué, L. B. *et al.* Comparison of Molecular Analysis and Histopathology for Axillary Lymph Node Staging in Primary Breast Cancer. *Diagnostic Mol. Pathol.* **00**, 69–76 (2012).
 55. Osako, T. *et al.* Accurate staging of axillary lymph nodes from breast cancer patients using a novel molecular method. *Br. J. Cancer* **105**, 1197–1202 (2011).
 56. Weaver, D. L. *et al.* Effect of occult metastases on survival in node-negative breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **364**, 412–21 (2011).
 57. Reed, W., Bøhler, P. J., Sandstad, B. & Nesland, J. M. Occult metastases in axillary lymph nodes as a predictor of survival in node-negative breast carcinoma with long-term follow-up. *Breast J.* **10**, 174–180 (2004).
 58. Kimbrough, C. W., McMasters, K. M., Quillo, A. & Ajkay, N. Occult metastases in node-negative breast cancer: A Surveillance, Epidemiology, and End Results-based analysis. *Surg. (United States)* **158**, 494–500 (2015).
 59. Hintzen, K. F. H. *et al.* Molecular analysis of sentinel lymph nodes in patients with breast cancer using one-step nucleic acid amplification (OSNA): Does not lead to overtreatment in the current era of de-escalating axillary management. *Surg. Oncol.* **35**, 224–228 (2020).
 60. Caudle, A. S. *et al.* American College of Surgeons Oncology Group (ACOSOG) Z0011: Impact on surgeon practice patterns. *Ann. Surg. Oncol.* **19**, 3144–3151 (2012).
 61. Peg, V. *et al.* Role of total tumour load of sentinel lymph node on survival in early breast cancer patients. *Breast* **33**, 8–13 (2017).
 62. Algara López, M. *et al.* OPTimizing Irradiation through Molecular Assessment of Lymph node (OPTIMAL): A randomized open label trial. *Radiat. Oncol.* **15**, 1–9 (2020).
 63. Hunter-Smith, A. E. & Rayter, Z. One-step nucleic acid amplification: The

- possible value in assessing sentinel lymph node metastasis during mastectomy. *Breast Cancer Targets Ther.* **10**, 13–21 (2018).
64. Vieites, B. *et al.* CK19 expression in breast tumours and lymph node metastasis after neoadjuvant therapy. *Histopathology* **69**, 239–249 (2016).
 65. Takamoto, K. *et al.* One-Step Nucleic Acid Amplification Assay for Detection of Axillary Lymph Node Metastases in Breast Cancer Patients Treated with Neoadjuvant Chemotherapy. *Ann. Surg. Oncol.* **23**, 78–86 (2016).
 66. Espinosa-Bravo, M. *et al.* Intraoperative assessment of sentinel lymph node by one-step nucleic acid amplification in breast cancer patients after neoadjuvant treatment reduces the need for a second surgery for axillary lymph node dissection. *Breast* **31**, 40–45 (2017).
 67. Iglesias, C. *et al.* Nodal metastatic load in papillary thyroid carcinoma. Morphological and molecular analysis with one-step nucleic acid amplification on more than 550 lymph nodes. *Endocrinol. Diabetes y Nutr.* (2020). doi:10.1016/j.endinu.2020.04.004
 68. Gonzalez, O. *et al.* Detection of thyroid papillary carcinoma lymph node metastases using one step nucleic acid amplification (OSNA): Preliminary results. *J. Investig. Surg.* **28**, 153–159 (2015).
 69. Aldecoa, I. *et al.* Molecularly determined total tumour load in lymph nodes of stage I–II colon cancer patients correlates with high-risk factors. A multicentre prospective study. *Virchows Arch.* **469**, 385–394 (2016).
 70. Gregor, A., Ujiie, H. & Yasufuku, K. Sentinel lymph node biopsy for lung cancer. *Gen. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **68**, 1061–1078 (2020).

AGRAÏMENTS

Agraïments

No m'agradaria acabar sense agrair el seu ajut a les persones que han fet possible aquest treball.

En primer lloc m'agradaria agrair els directors per orientar-me en aquesta feina: A Santiago per totes les oportunitats laborals, la confiança i per l'afecte que em demostra. A Vicente perquè d'ell són les idees, les respostes i la paciència.

Al Servei D'Anatomia Patològica on treballo i he desenvolupat aquest projecte i en especial a Mayte i M Alejandra, les meves companyes de grup per "cobrir-me" sempre que cal, a Maru per acompanyar-me en el dia a dia (també d'aquesta tesi) a Vicente pel cafè i aguantar les bromes que l'acompanyen i molt especialment a Elena que m'ha adoptat des del primer dia i m'ha assessorat en tot el que m'he deixat. Tampoc m'oblido de Natàlia que junt amb Inés i Esther Pallisa m'han motivat per no deixar la feina a mitges. De Carmela, que m'ha inspirat en la recta final, de Josep, que fa preguntes que fan pensar, ni de Joan Carles, a qui pregunto el que no sé a qui preguntar.

Amés dels directors, al desenvolupament de la tesi han contribuït d'alguna manera: els coautors dels *papers* que molt amablement m'han permès fer-los servir (especialment Martin sempre preparat amb el que calia); Sysmex aportant recursos, entusiasme i confiança; Jesús, pipetejant algun que altre gangli; Elena, emplenant taules, revisant sumes i textos; Manuel amb l'estadística i la paciència; el Covid-19 amb el temps que em faltava; a les amables treballadores del La Biblioteca de Vall d'Hebron, Biblioteca de la UAB i del doctorat de Cirurgia, que m'han hagut d'ajudar en moltes feines burocràtiques; Aina, Paula, Lola i Àssun, amb suggeriments ortogràfics; M Esperanza amb la recerca de cites i el Dr Biel Sansano preguntant en cada reunió familiar: *i la tesi com va?*

