

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

*FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRUGIA*



**CUANTIFICACIÓN DE ADN Y CK18 POR CITOMETRÍA DE FLUJO
MULTIPARAMÉTRICA EN EL CÁNCER DE MAMA INICIAL EN EL
TUMOR PRIMARIO Y GANGLIOS CENTINELAS.**

VALOR PRONÓSTICO A LARGO PLAZO.

TESIS DOCTORAL

Ana María Cubo Nava

2014

A Jose Carlos

A Carlos

A Sara

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría en las siguientes líneas expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral.

Al doctor Manuel Ramos Boyero, por la permitirme formar parte de este proyecto, por su cercanía y su trato amable en todo momento, por su ayuda generosa cuando la he necesitado.

A la doctora Juana Ciudad Pizarro, por su paciencia infinita y su cariño, por su disponibilidad y su templanza, por dedicar tanto tiempo y esfuerzo a que este trabajo saliera adelante.

A la doctora Ana Haro Pérez, excelente profesional y mejor persona, por ayudarme con el planteamiento y manejo estadístico de los datos, por hacer fácil lo difícil siempre con una sonrisa.

A Pilar González Zapatero, bibliotecaria del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, por su diligencia y buen hacer para conseguir la bibliografía de esta tesis.

Al doctor Javier Martín Moreiras, por dedicarme parte de su escaso tiempo para ayudarme a manejar los gestores de búsqueda bibliográfica.

Al Servicio de Citometría de la Universidad de Salamanca, por colaborar en este proyecto de forma desinteresada.

A las pacientes que se enfrentan a diario a esta terrible enfermedad y a pesar de ello nos animan a continuar investigando.

A mis compañeros del Servicio de Obstetricia y Ginecología, adjuntos y residentes, por ayudarme cada día a mejorar profesionalmente.

A mi familia, a Jose Carlos, Carlos y Sara, por el tiempo que les he robado para dedicarlo a esta tesis, por el esfuerzo conjunto que han hecho conmigo para sacar este proyecto adelante, por quererme y ayudarme siempre.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

A

ADN: Acido Desoxirribonucleico
AJCC: American Joint Committee on Cancer
AP: Anatomía Patológica
ASCO: American Society of Clinical Oncology

B

BAG: Biopsia con Aguja Gruesa
BSGC: Biopsia Selectiva del Ganglio Centinela

C

CDIS: Carcinoma Ductal In Situ
CDI: Carcinoma Ductal Infiltrante
CLI: Carcinoma Lobulillar Infiltrante
CTA: Células Tumorales Aisladas
CK18: Citokeratina 18
CK18/ADN: Técnica de doble marcaje, utilizando CK18 y cuantificación de ADN
CMF: Citometría de Flujo
CMFm: Citometría de Flujo Multiparamétrica

E

E: Especificidad

F

FFS: Fracción de la Fase S

G

GC: Ganglio Centinela
BRCA1: Gen Breast Cancer 1
BRCA2: Gen Breast Cancer 2

H

HE: Hematoxilina-Eosina

I

IHQ: Inmunohistoquímica

INE: Instituto Nacional de Estadística

L

LA: Linfadenectomía axilar

M

MI: Mamaria Interna
MTS: Metástasis

O

OR: Odds Ratio

P

PAAF: Punción Aspiración con Aguja Fina

R

RT: Radioterapia
RL: Recaida Local, recidiva local
RE: Receptores de estrógenos
RP: Receptores de progesterona
RR: Riesgo relativo

S

S: Sensibilidad
SG: Supervivencia Global
SLE: Supervivencia Libre de Enfermedad
SEER: Surveillance, Epidemiology and End Results Program

T

TNM: Tumor Node Metastases

V

VPN: Valor Predictivo Negativo
VPP: Valor Predictivo Positivo

INDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	EPIDEMIOLOGÍA.....	1
1.2	FACTORES DE RIESGO.....	4
1.3	ANATOMÍA PATOLÓGICA.....	5
1.4	CLASIFICACIÓN TNM DE LOS TUMORES.....	7
1.5	FACTORES PRONÓSTICOS Y PREDICTIVOS.....	15
1.6	DE LA CIRUGÍA CLÁSICA A LA CONSERVADORA. EL CONCEPTO DE GANGLIO CENTINELA.....	29
1.7	EL PAPEL DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO EN LA DETECCIÓN DE ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL GANGLIONAR EN EL CANCER DE MAMA.....	43
2.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	55
2.1	OBJETIVO GENERAL.....	58
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	58
3.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	61
3.1	POBLACIÓN DEL ESTUDIO.....	63
3.2	ESTUDIOS DEL TUMOR PRIMARIO Y EL GANGLIO CENTINELA.....	64
3.3	ESTUDIO DE LA SUPERVIVENCIA.....	72
3.4	MÉTODOS ESTADÍSTICOS.....	72
4.	RESULTADOS.....	75
4.1	DESCRIPCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE LAS PACIENTES, SEGUIMIENTO Y ESTIMACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA.....	77
4.2	DETERMINACIÓN DE LOS PATRONES DE EXPRESIÓN DE CK18, PLOIDÍA DE ADN Y CICLO CELULAR POR CITOMETRÍA DE FLUJO (CMFm) EN EL TUMOR PRIMARIO.....	81
4.3	UTILIDAD DE LOS PATRONES DE EXPRESIÓN DE CK18 Y PLOIDÍA DE ADN (CMFm) PARA LA DETECCIÓN DE INFILTRACIÓN TUMORAL DE LOS GANGLIOS CENTINELA.....	87
4.4	ESTUDIO DE LA CMFm COMO PRUEBA DIAGNÓSTICA PARA LA DETECCIÓN DE INFILTRACIÓN TUMORAL EN EL GANGLIO CENTINELA. COMPARACIÓN CON LA TÉCNICA INMUNOHISTOQUÍMICA CONVENCIONAL.....	92
4.5	ESTUDIO DE LA CORRESPONDENCIA ENTRE LAS CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DEL TUMOR Y LA AFECTACIÓN METASTÁSICA EN EL GANGLIO CENTINELA VALORADA MEDIANTE IHQ Y CMFm.....	100

4.6	VALOR PRONÓSTICO DE LA PLOIDÍA DE ADN Y DEL CICLO CELULAR (FFS) ESTIMADOS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO MULTIPARAMÉTRICA (CMFm)	104
5.	DISCUSIÓN	119
5.1	PATRONES DE EXPRESIÓN DE CK18, PLOIDÍA DE ADN Y CICLO CELULAR POR CITOMETRÍA DE FLUJO EN EL TUMOR PRIMARIO	121
5.2	COMPARACIÓN DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE CK18 Y DE LA PLOIDÍA DE ADN POR CITOMETRÍA DE FLUJO DEL TUMOR PRIMARIO CON EL DE LAS CÉLULAS INFILTRANTES EN LOS GANGLIOS CENTINELA POSITIVOS MEDIANTE LA CMFm.	126
5.3	UTILIDAD DEL USO DE LOS PATRONES DE EXPRESIÓN DE CK18 Y PLOIDÍA DE ADN COMO PRUEBA DIAGNÓSTICA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LA INFILTRACIÓN TUMORAL DEL GANGLIO CENTINELA. COMPARACIÓN CON EL ESTUDIO ANATOMO-PATOLÓGICO MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA Y CON LA EVOLUCIÓN CLÍNICA DE LAS PACIENTES.	129
5.4	BÚSQUEDA DE FACTORES CAPACES DE PREDECIR EL POTENCIAL METASTÁSICO DEL TUMOR PRIMARIO EN EL GANGLIO CENTINELA: DATOS BIOLÓGICOS, CLÍNICOS, DE LABORATORIO Y/O PROPORCIONADOS POR LA CMFm. ANÁLISIS UNI Y MULTIVARIANTE.	140
5.5	ESTUDIO DE LA CORRESPONDENCIA ENTRE LAS CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS Y/O FACTORES PRONÓSTICOS EN EL TUMOR PRIMARIO Y LAS VARIABLES RELACIONADAS CON EL ESTUDIO DEL CICLO CELULAR, VALORADAS MEDIANTE CMF (FFS, PLOIDÍA).	148
5.6	ESTUDIO DE LA SUPERVIVENCIA GLOBAL Y LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD EN FUNCIÓN DE LOS FACTORES PRONÓSTICOS PRESENTES EN EL TUMOR PRIMARIO Y LAS VARIABLES RELACIONADAS CON EL ESTUDIO DEL CICLO CELULAR, VALORADAS MEDIANTE CMFm (PLOIDÍA Y FFS). PROPUESTA DE CREACIÓN DE GRUPOS PRONÓSTICO.	155
6.	CONCLUSIONES.....	161
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	169

INDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1.- Factores de riesgo para desarrollar cancer de mama</i>	4
<i>Tabla 2.- Clasificación en tipos y subtipos histológicos del cancer de mama</i>	7
<i>Tabla 3.- Factores pronósticos en el cáncer de mama</i>	16
<i>Tabla 4.- Grupos de riesgo en pacientes con cáncer de mama y ganglios axilares negativos, en función de la presencia o ausencia de otros factores de riesgo</i>	16
<i>Tabla 5.- Mortalidad específica por cáncer de mama (%) a los 5 años en función de la afectación ganglionar, según datos del SEER</i>	19
<i>Tabla 6.- Mortalidad específica por cáncer de mama (%) a los 5 años en función del estadio TNM y el grado histológico, según datos del SEER</i>	20
<i>Tabla 7.- Estudios prospectivos aleatorizados comparando la supervivencia de pacientes en estadios I y II de cáncer de mama con cirugía conservadora + radioterapia y mastectomía</i>	32
<i>Tabla 8.- Valoración de las técnicas de marcaje en la BSGC</i>	38
<i>Tabla 9.- Descripción de las características de las pacientes y las variables de los tumores</i>	79
<i>Tabla 10.- Descripción del número (N) y porcentaje (%) de eventos adversos en nuestro grupo de estudio</i>	80
<i>Tabla 11.- Valores de los tiempos globales de las variables relacionadas con el seguimiento, la supervivencia y eventos adversos de la enfermedad (meses)</i>	81
<i>Tabla 12.- Expresión de CK18 en el tumor primario. Resultados expresados como número (N) y % de casos</i>	82
<i>Tabla 13.- Presencia de clones diploides, hipodiploides e hiperdiploides con diferentes índices de ADN en la serie de tumores primarios</i>	84
<i>Tabla 14.- Patrones de ploidía en los 125 tumores primarios estudiados</i>	85
<i>Tabla 15.- Parámetros estadísticos descriptivos referentes a la Síntesis y a la FFS (S+G2M)</i>	85
<i>Tabla 16.- Valores de la Síntesis y la FFS (S+G2M) estratificadas en terciles</i>	86
<i>Tabla 17.- Relación entre la ploidía y la FFS en los diferentes percentiles estudiados</i>	86
<i>Tabla 18.- Relación entre la ploidía y la FFS al estratificarla en terciles</i>	87
<i>Tabla 19.- Número y tipo de clones detectados en el ganglio centinela</i>	88

<i>Tabla 20.- Comparación del patrón de ploidía del ADN entre el tumor primario (TP) y los ganglios centinela (GC) en los casos con infiltración ganglionar tumoral estimada mediante citometría de flujo</i>	90
<i>Tabla 21.- Comparación del patrón de expresión de CK18 entre el tumor primario (TP) y los ganglios centinela (GC) en los casos con infiltración ganglionar tumoral estimada mediante citometría de flujo</i>	91
<i>Tabla 22.- Tabla de contingencia relacionando el resultado de la infiltración ganglionar obtenido mediante IHQ y CMF</i>	93
<i>Tabla 23.- Cálculo de la Sensibilidad, Especificidad, Valor Predictivo Positivo y Valor Predictivo Negativo</i>	93
<i>Tabla 24.- Patrones de expresión de CK18 y ploidía en tumor primario y ganglios centinela detectados por citometría de flujo en los casos discordantes entre la citometría de flujo y el estudio anatomopatológico mediante inmunohistoquímica</i>	96
<i>Tabla 25.- Relación de la infiltración ganglionar estimada por Citometría de Flujo Multiparamétrica (CMFm) e Inmunohistoquímica (IHQ) y su relación con la aparición de evento adverso</i>	98
<i>Tabla 26.- Características tumorales con asociación estadísticamente significativa en el análisis univariante con la infiltración metastásica del ganglio centinela valorada mediante IHQ</i>	100
<i>Tabla 27.- Características tumorales con asociación estadísticamente significativa en el análisis univariante con la infiltración metastásica del ganglio centinela valorada mediante CMFm</i>	101
<i>Tabla 28.- Variables con asociación estadísticamente significativa a la infiltración tumoral del ganglio centinela en el análisis multivariante</i>	102
<i>Tabla 29.- Parámetros relacionados estadísticamente con la infiltración metastásica en ganglio centinela, valorada mediante IHQ y CMFm, en el análisis univariante</i>	103
<i>Tabla 30.- Relación de las características clínico-patológicas del tumor con las variables asociadas al ciclo celular estudiadas mediante CMF (Ploidía y FFS)</i>	106
<i>Tabla 31.- Estimación de la Supervivencia Libre de Enfermedad (SLE) de las pacientes con cáncer de mama en nuestro estudio, teniendo en cuenta las variables clínico patológicas y las relacionadas con el ciclo celular, estimadas por citometría de flujo</i>	114
<i>Tabla 32.- Estimación de la Supervivencia Global (SG) de las pacientes con cáncer de mama en nuestro estudio, teniendo en cuenta las variables clínico patológicas y las relacionadas con el ciclo celular, estimadas por citometría de flujo</i>	115

INDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.- Incidencia del cáncer en España en Mujeres (Estimación para el año 2015)</i>	1
<i>Figura 2.- Mortalidad por cáncer en España en Mujeres (Estimación para el año 2015)</i>	2
<i>Figura 3.- Prevalencia a 5 años del cáncer en España en Mujeres (estimación para el año 2015)</i>	2
<i>Figura 4.- Evolución de la supervivencia en España en pacientes con cáncer de mama</i>	3
<i>Figura 5.- Esquema anatómico de los niveles de Berg para la disección axilar</i>	33
<i>Figura 6.- Esquema representativo del concepto de ganglio centinela</i>	34
<i>Figura 7.- Esquema representativo de la localización intrapreatoria del ganglio centinela mediante colorantes vitales y trazadores isotópicos</i>	37
<i>Figura 8.- Representación gráfica esquemática del funcionamiento de un citómetro de flujo</i>	46
<i>Figura 9.- Representación esquemática del ciclo celular</i>	48
<i>Figura 10.- Ejemplo representativo de la estrategia de análisis donde se muestran en rojo las células individuales íntegras en un diagrama FL2A/FL2-W</i>	52
<i>Figura 11.- Ejemplo representativo de cuantificación de ADN sobre una muestra de médula ósea marcada con un anticuerpo específico de células plasmáticas (CD38-CD138)</i>	52
<i>Figura 12.- Representación en "dot plot" e histograma que muestra el marcaje simultáneo de una muestra de tumor primario de mama con CK18 y cuantificación de ADN con Ioduro de propidio</i>	53
<i>Figura 13.- Ejemplo representativo de la selección de las células CK+ (eventos en color rojo)</i>	70
<i>Figura 14.- Ejemplo representativo de la adquisición de información en dos pasos</i>	71
<i>Figura 15.- Representación en "dot plot" de un tumor primario aneuploide</i>	83
<i>Figura 16.- Estudio comparativo entre TP (A y C) y GC (B y D) de un tumor diploide (A y B) y otro aneuploide (C y D)</i>	89
<i>Figura 17.- Comparación entre TP (diagrama A) y GC (diagramas B y C)</i>	91
<i>Figura 18.- Análisis correlativo de muestras en una misma paciente</i>	92
<i>Figura 19.- Imágenes correspondientes al caso número 113</i>	95
<i>Figura 20.- Imágenes correspondientes al caso número 47</i>	95

<i>Figura 21.- Representación gráfica de la infiltración tumoral del ganglio centinela estimada mediante CMF (A) e IHQ (B), agrupada en función de la evolución clínica de las pacientes</i>	97
<i>Figura 22.- Representación gráfica de la Supervivencia Libre de Enfermedad en función de la infiltración tumoral del ganglio centinela valorada mediante CMF (A) e IHQ (B)</i>	99
<i>Figura 23.- Representación gráfica de la Supervivencia Global en función de la infiltración tumoral del ganglio centinela valorada mediante CMF (A) e IHQ (B)</i>	99
<i>Figura 24.- Representación gráfica de la relación entre la Supervivencia Libre de Enfermedad (A) y la Supervivencia Global (B) con el tipo histológico</i>	107
<i>Figura 25.- Representación gráfica de la relación entre la Supervivencia Libre de Enfermedad (A) y la Supervivencia Global (B) con el grado tumoral</i>	108
<i>Figura 26.- Representación gráfica de la relación entre la Supervivencia Libre de Enfermedad (A) y la Supervivencia Global (B) con el tamaño tumoral</i>	109
<i>Figura 27.- Representación gráfica de la relación entre la Supervivencia Libre de Enfermedad (A) y la Supervivencia Global (B) con la infiltración tumoral del ganglio centinela, valorada por IHQ</i>	110
<i>Figura 28.- Representación gráfica de la relación entre la Supervivencia Libre de Enfermedad (A) y la Supervivencia Global (B) con la infiltración tumoral del ganglio centinela, valorada por CMFm</i>	110
<i>Figura 29.- Representación gráfica de la relación entre la Supervivencia Libre de Enfermedad (A) y la Supervivencia Global (B) con la expresión de la proteína p53</i>	111
<i>Figura 30.- Representación gráfica de la relación entre la Supervivencia Libre de Enfermedad (A) y la Supervivencia Global (B) con la ploidía</i>	112
<i>Figura 31.- Representación gráfica de la relación entre la Supervivencia Libre de Enfermedad (A) y la Supervivencia Global (B) con la FFS</i>	113
<i>Figura 32.- Representación gráfica de la relación entre la Supervivencia Libre de Enfermedad (A) y la Supervivencia Global (B) con la Síntesis</i>	113
<i>Figura 33.- Representación gráfica de la relación entre la Supervivencia Libre de Enfermedad (A) y la Supervivencia Global (B) con la FFS en tumores diploides</i>	116
<i>Figura 34.- Representación gráfica de la relación entre la Supervivencia Libre de Enfermedad (A) y la Supervivencia Global (B) con la FFS en tumores aneuploides</i>	117

1. INTRODUCCIÓN

1.1 EPIDEMIOLOGÍA

El cáncer de mama es el tumor maligno más frecuente de la población femenina española, y representa alrededor del 25% de todos los tumores incidentes. Su incidencia en España varía entre 40 y 75 por 100.000 mujeres, según los datos obtenidos por los distintos registros españoles de cáncer de base poblacional (Figura 1). La posibilidad actual de que una mujer española sufra un cáncer de mama antes de cumplir 75 años se sitúa entre un 5%. Esto significa que una de cada 20 mujeres desarrollará un cáncer de mama antes de esa edad (1).



Figura 1.- Incidencia del cáncer en España en Mujeres (Estimación para el año 2015). Fuente: GLOBOCAN 2008. <http://www.dep-iarc.fr>. Datos extrapolados para la población estimada para 2015 en España por el INE.

En España se diagnostican unos 22.000 casos al año, lo que representa casi el 30% de todos los tumores del sexo femenino en nuestro país. La mayoría de los casos se diagnostican entre los 35 y los 80 años, con un máximo entre los 45 y los 65. No obstante, aún no disponemos de un sistema Nacional de Registro de Tumores para conocer las cifras exactas (2).

Tanto el número de casos como las tasas de incidencia aumentan lentamente en España y en el mundo, probablemente debido al envejecimiento de la población y a un diagnóstico cada vez más precoz. El aumento de la incidencia se estima en un 1-2% anual y es constante desde 1960 en Estados Unidos (3).

Además, el cáncer de mama constituye, junto con el cáncer colorrectal, la primera causa de muerte por cáncer en mujeres, con una tasa de mortalidad de 28,2 por 100.000, lo que representa el 15,6% del total de muertes por cáncer en la población femenina en España (1, 4) (Figura 2).



Figura 2.- Mortalidad por cáncer en España en Mujeres (Estimación para el año 2015). Fuente: GLOBOCAN 2008. <http://www.dep-iarc.fr>. Datos extrapolados para la población estimada para 2015 en España por el INE.

La prevalencia del cáncer de mama a 5 años en mujeres en España se estima en 40 de cada 100.000 mujeres (Figura 3). Es el cáncer más prevalente en este grupo poblacional.

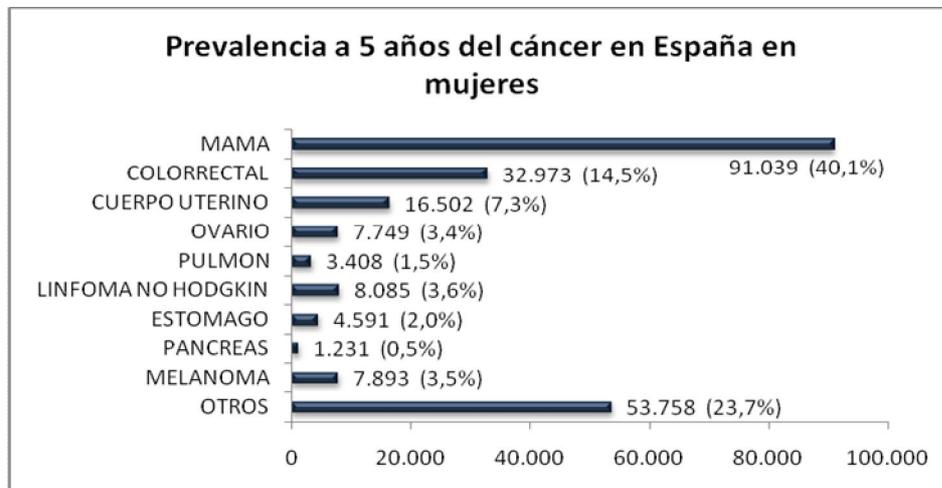


Figura 3.- Prevalencia a 5 años del cáncer en España en Mujeres (estimación para el año 2015). Fuente: GLOBOCAN 2008. <http://www.dep-iarc.fr>. Datos extrapolados para la población estimada para 2015 en España por el INE.

Esta alta prevalencia puede explicarse en gran parte por el aumento de la supervivencia en las pacientes con cáncer de mama en España durante los últimos 20 años (Figura 4). La implantación del screening poblacional mediante mamografías periódicas

permite el diagnóstico precoz de la enfermedad y por lo tanto un abordaje temprano que mejora el éxito terapéutico (5, 6). Por otro lado, la investigación constante en este campo ha permitido lograr tratamientos específicos contra células diana concretas que mejoran la eficacia terapéutica disminuyendo los efectos adversos.

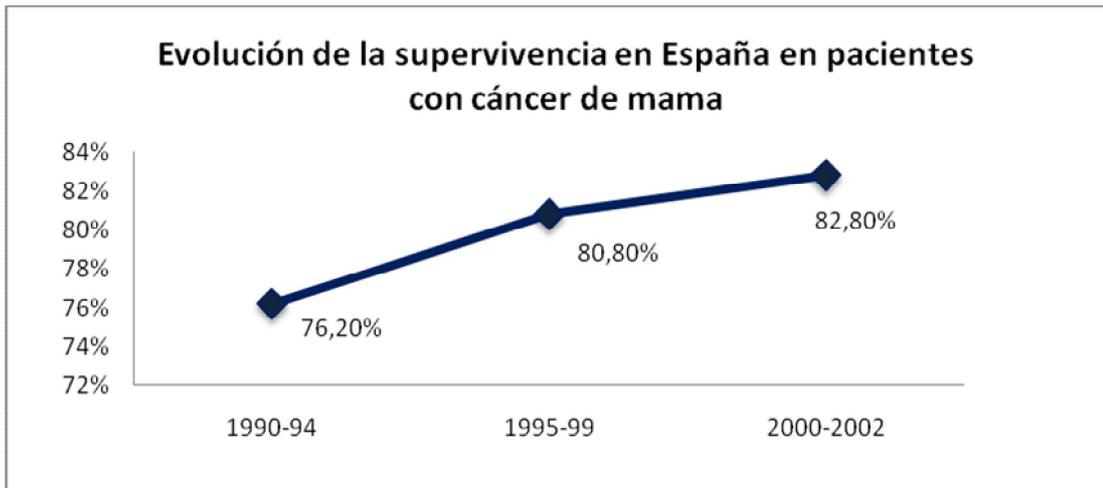


Figura 4.- Evolución de la supervivencia en España en pacientes con cáncer de mama. Fuente: Estudio Eurocare 4 (Verdecchia A. et al, 2007).

1.2 FACTORES DE RIESGO

La etiología del cáncer es multifactorial y es el resultado de la interacción entre factores genéticos y ambientales.

Algunas mujeres presentan factores que aumentan el riesgo de desarrollar cáncer de mama. Los factores de riesgo más importantes son: la edad mayor de 50 años, la historia familiar de cáncer de mama y ovario, la alta densidad mamaria observada en una mamografía realizada con la técnica correcta y las lesiones proliferativas atípicas de la mama (7) (Tabla 1) .

Tabla 1.- Factores de riesgo para desarrollar cáncer de mama. Clinical Practice Breast Cancer Screening, 2011.

FACTORES DE RIESGO PARA DESARROLLAR CÁNCER DE MAMA		RR*
Mutación BRCA1-BRCA2		10-21
Historia familiar de cáncer de mama	1 familiar de primer grado	1.5-2
	2 familiares de primer grado	3
	Mutación BRCA1-BRCA2	4
	3 o más familiares de primer grado	1.2-1.5
Radioterapia torácica (especialmente a edades inferiores a 30 años)		7-17
Factores hormonales	Primiparidad tardía (>30 años) o nuliparidad	1.2-1.7
	Menarquia temprana (< 12 años) o menopausia tardía (> 55 años)	1.2-1.3
	Terapia hormonal sustitutiva combinada (estrógenos-progesterona) por períodos prolongados (>5 años)	1.5
Obesidad en postmenopausia		1.2-1.9
Alcohol (más de dos copas de vino al día o equivalente vs ninguna)		1.2
Tabaquismo		1.2
Vida sedentaria		1.1-1.8
Raza blanca		1.1-1.2
Alta densidad mamaria		5
Hiperplasias epiteliales atípicas (ductal y/o lobulillar), CIS (ductal y/o lobulillar)		4
* RR=Riesgo Relativo		

1.3 ANATOMÍA PATOLÓGICA

La Tercera Edición de la Clasificación de la OMS para los tumores de la mama (2003), distingue 21 variedades de carcinomas invasivos y dos categorías de neoplasias intraepiteliales, basándose en los perfiles tanto morfológicos como inmunohistoquímicos de los tumores. También hace referencia a otras enfermedades que pueden afectar a la mama, aunque con mucha menos frecuencia, como la enfermedad de Paget del pezón, los tumores phillodes, sarcomas, linfomas... (8, 9)

La Cuarta Edición de la Clasificación de la OMS para los tumores de la mama (2013) (10) supone una actualización de la anterior, e incluye todas las lesiones tanto neoplásicas como preneoplásicas de la mama, así como nuevos aspectos en cuanto a la terminología que están más acordes con el conocimiento actual de la patología. Las definiciones histopatológicas se complementan con una descripción de las características clínicas, epidemiológicas, macroscópicas, genéticas, pronósticas y predictivas (11).

A continuación señalaremos algunas de las características de las variedades más comunes de carcinomas mamarios.

1.3.1 CARCINOMAS DUCTALES

CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE: es el más frecuente (70-80%). Aunque se origina en el epitelio ductal, con gran frecuencia sobrepasa la pared del conducto e invade los tejidos de la mama. Con el tiempo, el carcinoma ductal invasivo puede propagarse hacia los ganglios linfáticos axilares y a otras zonas, dando lugar a metástasis a distancia. Tiene el peor pronóstico de todos los carcinomas ductales.

CARCINOMA PAPILAR: es poco frecuente, representando menos del 1-2 % de los casos de cáncer de mama invasivo. Suele diagnosticarse en mujeres postmenopáusicas. El carcinoma papilar infiltrante es una variedad rara de crecimiento lento y buen pronóstico.

COMEDO-CARCINOMA: tiene un crecimiento denso dentro de los conductos. Generalmente tiene buen pronóstico.

CARCINOMA MEDULAR: representa el 5-7%. Suelen ser tumores grandes y de bajo grado. Aunque puede aparecer a cualquier edad, suele afectar a mujeres de 45-55 años y es más frecuente en mujeres que tienen una mutación del gen BRCA1. Típicamente, las células del carcinoma medular son de alto grado con respecto a su apariencia y de

bajo grado con respecto a su comportamiento, es decir, aparecen como células cancerosas agresivas y muy anómalas, pero no actúan como ellas. El carcinoma medular no crece rápidamente y por lo general no se propaga fuera de la mama hacia los ganglios linfáticos. Por este motivo, generalmente es más fácil de tratar que otros tipos de cáncer de mama.

CARCINOMA TUBULAR: es un subtipo poco común de carcinoma ductal invasivo (tan solo constituye el 1-2 % de todos los casos de cáncer de mama). Generalmente son tumores pequeños formados por células con forma de tubo que suelen ser de bajo grado. Tienen mejor pronóstico que el carcinoma ductal infiltrante pero peor que el medular.

CARCINOMA MUCINOSO O COLOIDE: supone el 2-3% del total y se caracteriza por estar formado por nidos de células epiteliales rodeados por acúmulos de mucina. Tiene un crecimiento lento y suele ser de gran tamaño. Se asocia a buen pronóstico.

1.3.2 CARCINOMAS LOBULILLARES

CARCINOMAS LOBULILLARES: Proviene de los pequeños conductos terminales de la mama. El carcinoma lobulillar infiltrante, que representa entre un 5% y un 10% del total, suele ser multicéntrico y/o bilateral y tiene mejor pronóstico que el carcinoma ductal infiltrante.

1.3.3 TIPOS ESPECIALES

ENFERMEDAD DE PAGET: Su incidencia es menor del 5% y su aparición se relaciona con cambios en la piel de larga evolución en forma de eccema, afectando a pezón y areola. El tumor subyacente puede ser intraductal o ductal invasivo. Su presencia indica la invasión epidérmica por células de Paget (grandes células malignas claras con pequeños núcleos oscuros).

CARCINOMA INFLAMATORIO: supone un 1% del total y se caracteriza clínicamente por edema de la piel ("*Piel de naranja*"), eritema, calor y endurecimiento de la mama subyacente. Está producido por invasión de los linfáticos dérmicos por células tumorales. Es una variedad de mal pronóstico.

1.3.4 CARCINOMA DE MAMA IN SITU

Este tipo de carcinoma merece consideración aparte puesto que presenta características peculiares que lo diferencian de los anteriores. La principal es que en su crecimiento no sobrepasa la membrana basal. Su diagnóstico es cada vez más frecuente debido a las campañas de diagnóstico precoz en mujeres asintomáticas, ya que en la mayoría de las ocasiones son lesiones no palpables. Representa el 15-20% de las neoplasias mamarias y se diferencian 2 tipos histológicos: el ductal in situ, y el lobulillar in situ que puede ser multicéntrico.

Tabla 2.- Clasificación en tipos y subtipos histológicos del cáncer de mama

TIPOS HISTOLÓGICOS DE CÁNCER DE MAMA	
DUCTALES	Intraductal Papilar Infiltrante Medular Tubular Mucinoso
LOBULILLARES	
ESPECIALES	Enfermedad de Paget Carcinoma inflamatorio
MIXTOS	
CARCINOMA IN SITU	

1.4 CLASIFICACIÓN TNM DE LOS TUMORES

La clasificación TNM, empleada para determinar la extensión anatómica de las neoplasias basada en apreciaciones clínicas (cTNM) o anatomopatológicas (pTNM) se utiliza en el cáncer mamario desde hace más de 40 años (12) y es la más aceptada actualmente. Esta clasificación nos da una idea de la extensión de la enfermedad, lo que es útil para determinar su pronóstico, y nos sirve de guía para establecer el manejo de la misma. Los continuos

cambios en el diagnóstico y tratamiento hacen que se introduzcan modificaciones periódicas de dicha clasificación (13, 14).

En 2010, el grupo de trabajo sobre cáncer de mama del American Joint Committee on Cancer (AJCC) se reunió para revisar los criterios de clasificación TNM en esta patología e incorporar esta nueva revisión en la séptima edición del *Cancer Staging Manual*, recomendándose a los Registros de Tumores su utilización a partir de enero de 2010 (15).

1.4.1 ESTADIFICACIÓN CLÍNICA (c) Y ESTADIFICACIÓN PATOLÓGICA (p)

Cada característica de un tumor (tamaño, afectación ganglionar, metástasis) se puede evaluar e informar tanto clínica como patológicamente. La clasificación patológica se considera generalmente que es más precisa que la estadificación clínica. Sin embargo, hay casos en los que la clasificación clínica es útil para hacer recomendaciones en el tratamiento inicial y puede condicionar las características de los pacientes elegibles para formar parte de los ensayos clínicos. La aparición de patología posterior puede alterar la clasificación TNM clínica.

1.4.2 MICROMETASTASIS Y CÉLULAS TUMORALES AISLADAS

El empleo de nuevas técnicas inmunohistoquímicas o moleculares ha hecho posible la detección de pequeños grupos de células o incluso de células neoplásicas aisladas en los ganglios linfáticos. La quinta edición del *AJCC Cancer Staging Manual* (16) consideraba micrometástasis a toda metástasis menor de 2.0 mm de tamaño, clasificándolas como pN1. Sin embargo, su significación biológica es mal conocida, por lo que la sexta edición del *AJCC Cancer Staging Manual* (17, 18) asignó un tamaño inferior límite a las **micrometástasis**, definiéndolas como metástasis mayores de 0.2 mm e inferiores a 2.0 mm, que se clasifican como pN1mi. Los depósitos de células menores se consideran **células tumorales aisladas** (CTA) y se clasifican como N0. Esta misma consideración se mantiene en la séptima edición del *AJCC Cancer Staging Manual* (15, 19).

Las células tumorales aisladas no muestran respuesta tisular, estroma ni actividad proliferativa, y aunque pueden ser detectadas por técnicas convencionales con hematoxilina-eosina (HE), generalmente se evidencian con inmunohistoquímica o mediante técnicas moleculares. En la clasificación actual se añade el símbolo (i) o (mol) para los casos así detectados, que son negativos con HE (15, 19).

1.4.3 NUMERO DE GANGLIOS CON METÁSTASIS

El número absoluto de ganglios positivos es uno de los factores pronóstico más importante, y así se tiene en cuenta en la clasificación pN. Pacientes con uno a tres ganglios axilares positivos (con al menos un cúmulo neoplásico mayor de 2 mm y todos mayores de 0.2 mm) se clasifican como pN1a, con cuatro a nueve ganglios axilares positivos como pN2a y con diez o más ganglios axilares positivos como pN3a (15). La decisión de dividir a los pacientes en estos tres grupos se basa en resultados de estudios previos.

1.4.4 METÁSTASIS EN GANGLIOS INFRACLAVICULARES

El estado de los ganglios infraclaviculares, ganglios del nivel III o internos al borde medial del músculo pectoral menor se agrupaban en ediciones anteriores con el resto de los ganglios axilares. Sin embargo, debido a que su afectación implica un pronóstico muy desfavorable (20), desde el 2002 se ha clasificado como N3a (18). Este hecho se mantiene en la séptima edición (15).

1.4.5 METÁSTASIS EN GANGLIOS NO AXILARES

En ediciones anteriores, la afectación de ganglios de la cadena mamaria interna (MI) se clasificaba como N3. Estudios posteriores (21) demostraron que el impacto en la supervivencia de los ganglios MI positivos depende del estado de los ganglios axilares y también está asociado al tamaño de esos ganglios MI positivos. Así, en la sexta edición del AJCC, los ganglios MI positivos detectados con la técnica del ganglio centinela pero no clínicamente o por estudios de imagen, se clasifican como pN1b si no existen ganglios axilares positivos, pN1c si se asocian a uno o a tres ganglios axilares positivos y pN3b con cuatro o más ganglios axilares positivos (18). La existencia de ganglios MI positivos detectados por examen clínico o estudios de imagen se clasifica como N2b/pN2b en ausencia de ganglios axilares positivos y como N3b/pN3b si existen ganglios axilares positivos. Esta clasificación se mantiene en la séptima edición del AJCC (15).

Las metástasis en ganglios supraclaviculares siguen considerándose como N3c/pN3c (15).

1.4.6 GANGLIO CENTINELA

La clasificación pN está basada en la disección axilar, con o sin estudio del ganglio centinela. Cuando alude solamente en el ganglio centinela porque no se ha llevado a cabo una posterior disección axilar, se añade (sn) al estadio correspondiente.

1.4.7 CLASIFICACIÓN TNM SEGÚN LA 7ª EDICIÓN DEL AJCC CANCER STAGING SYSTEM (2010)

1.4.7.1 TUMOR PRIMARIO (T)

1.4.7.1.1 Clasificación clínica

Tx	Tumor primario que no puede ser valorado.
T0	Sin evidencia de tumor primario.
Tis	Carcinoma in situ.
Tis (CDIS)	Carcinoma ductal in situ o carcinoma intraductal
Tis (CLIS)	Carcinoma lobulillar in situ
Tis (Paget)	Enfermedad de Paget sin tumor asociado. La enfermedad de Paget asociada a tumor se clasifica de acuerdo al tamaño del tumor.
T1	Tumor menor o igual de 20 mm en su diámetro mayor.
T1mi	El tumor mide ≤ 1 mm en su diámetro mayor
T1a	El tumor mide > 1 mm pero ≤ 5 mm en su diámetro mayor
T1b	El tumor mide > 5 mm pero ≤ 10 mm en su diámetro mayor
T1c	El tumor mide > 10 mm pero ≤ 20 mm en su diámetro mayor
T2	Tumor >20 mm pero ≤ 50 mm en su diámetro mayor.
T3	Tumor mayor de 50 mm en su diámetro mayor.
T4	Cualquier tamaño con extensión directa a la pared torácica y/o a la piel (ulceración o nódulos cutáneos):
T4a	Extensión a la pared torácica que no sólo incluye adherencia o invasión a los músculos pectorales.
T4b	Ulceración y/o nódulos satélites ipsilaterales y/o edema (incluyendo la piel de naranja), sin reunir los criterios para carcinoma inflamatorio de mama.
T4c	T4a + T4b.
T4d	Carcinoma inflamatorio.

1.4.7.1.2 Clasificación patológica

Las categorías pT se corresponden con las categorías T.

1.4.7.2 GANGLIOS LINFÁTICOS REGIONALES (N)

1.4.7.2.1 Clasificación clínica (c):

cNX	Los ganglios linfáticos regionales no pueden evaluarse (p. ej., se extirparon previamente).
cN0	No hay metástasis en los ganglios linfáticos regionales.
cN1	Metástasis en ganglios linfáticos ipsilaterales en los niveles I y II no adheridos, móviles.
cN2	Metástasis en ganglios linfáticos ipsilaterales en los niveles I y II que están clínicamente fijos o apelmazados o metástasis en ganglios mamaros internos ipsilaterales detectados clínicamente* en ausencia de metástasis a ganglio linfático axilar clínicamente manifiesta.
cN2a	Metástasis en ganglios linfáticos ipsilaterales en los niveles I y II, clínicamente fijos o apelmazados.
cN2b	Metástasis sólo en ganglios mamaros internos ipsilaterales detectados clínicamente en ausencia de metástasis clínicamente manifiesta a ganglio linfático axilar en los niveles I y II.
cN3	Metástasis en ganglio(s) linfático(s) infraclavicular(es) ipsilateral(es) (grado III axilar) con implicación de ganglio linfático axilar de nivel I o II; o metástasis en ganglio(s) linfático(s) mamario(s) interno(s) ipsilateral(es) detectado(s) clínicamente* con metástasis manifiesta en ganglios linfáticos axilares de niveles I o II; o metástasis en ganglio(s) linfático(s) supraclavicular(es) ipsilateral(es) con implicación axilar o mamaria interna de ganglios linfáticos o sin ésta.
cN3a	Metástasis en ganglio(s) linfático(s) infraclavicular(es) ipsilateral(es).
cN3b	Metástasis en ganglio(s) linfático(s) mamario(s) interno(s) ipsilateral(es) y ganglios linfáticos axilares.
cN3c	Metástasis en ganglio(s) linfático(s) supraclavicular(es) ipsilateral(es).

* *Detectado clínicamente* se define como encontrado mediante estudios de imagen (excluyendo la linfografía isotópica) o mediante examen clínico que demuestra características altamente sospechosas de neoplasia o una supuesta macrometástasis patológica sobre la base de una biopsia de aspiración con aguja fina con examen citológico. La confirmación de enfermedad metastásica clínicamente manifiesta mediante aspiración con aguja fina sin biopsia escisional se designa con un sufijo (f), por ejemplo cN3a(f). La biopsia por escisión de un ganglio linfático o la biopsia de un ganglio centinela, ante la ausencia de asignación pT, se clasifica como N clínico, por ejemplo cN1.

La información correspondiente a la confirmación de estatus ganglionar se designará con factores específicos al sitio tales como clínicos, aspiración con aguja fina, biopsia central o biopsia de ganglio centinela. La clasificación patológica (pN) se usa para la escisión o biopsia de ganglio centinela sólo en conjunción con una asignación patológica T.

1.4.7.2.2 Clasificación patológica (pN):

La clasificación se fundamenta en la disección de ganglios linfáticos axilares con o sin biopsia del ganglio linfático centinela. Si no hay vaciamiento axilar asociado por tratarse de un ganglio centinela negativo, debe especificarse como (sn) para "ganglio centinela" después de la clasificación correspondiente. Ejemplo: pN0(sn).

pNX	No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales
pN0	No se identificaron metástasis en ganglios linfáticos regionales por medios histológicos*.
pN0(i-)	Histológicamente, no hay metástasis regional a ganglio linfático regional, IHC negativo.
pN0(i+)	Células malignas en ganglio(s) linfático(s) regional(es) ≤ 0.2 mm (detectado mediante H&E o IHC, incluyendo la ITC).
pN0(mol-)	Histológicamente no hay metástasis a ganglio linfático regional, hallazgos moleculares negativos (RT-PCR).
pN0(mol+)	Hallazgos moleculares positivos (RT-PCR), pero no se localizó metástasis a ganglio linfático regional alguno mediante histología o IHC.
pN1	Micrometástasis o metástasis en 1 a 3 ganglios axilares o metástasis en ganglios mamarios internos con detección de metástasis localizada mediante biopsia de ganglio linfático centinela, pero sin detección clínica*.
pN1(mi)	Micrometástasis ($>0,2$ mm y/o >200 células pero ninguna $>2,0$ mm).
pN1a	Metástasis en 1–3 ganglios linfáticos axilares, al menos una metástasis $>2,0$ mm
pN1b	Metástasis en ganglios mamarios internos con micrometástasis o macrometástasis detectada mediante biopsia de ganglio linfático centinela, pero sin detección clínica*.
pN1c	Metástasis en 1–3 ganglios linfáticos axilares y ganglios linfáticos mamarios internos con micrometástasis o macrometástasis localizado mediante biopsia de ganglio linfático, pero sin detección clínica*.
pN2	Metástasis en 4 a 9 ganglios linfáticos axilares o metástasis en ganglios linfáticos mamarios internos detectadas clínicamente** en ausencia de metástasis a ganglio linfático axilar.
pN2a	Metástasis en 4 a 9 ganglios axilares (al menos un depósito tumoral > 2 mm)
pN2b	Metástasis en ganglios linfáticos mamarios internos detectados clínicamente** en ausencia de metástasis a ganglio linfático axilar.
pN3	Metástasis en 10 o más ganglios axilares, o metástasis en ganglios infraclaviculares (nivel III axilar), o metástasis en ganglios mamarios

internos ipsilaterales detectados clínicamente* en presencia de uno o más ganglios axilares afectados de niveles I o II; o metástasis en >3 ganglios linfáticos axilares y ganglios linfáticos internos mamarios con micrometástasis o macrometástasis localizada mediante biopsia de ganglio linfático centinela pero sin detección clínica; o metástasis en ganglios linfáticos ipsilaterales supraclaviculares.

pN3a	Metástasis en 10 o más ganglios axilares (con al menos un depósito tumoral > 2mm) o metástasis en ganglios infraclaviculares (nivel III axilar).
pN3b	Metástasis en >3 ganglios linfáticos axilares y ganglios mamarios internos detectados clínicamente en presencia de metástasis a ganglio linfático axilar de ≥ 1 ganglio linfático axilar positivo; o metástasis en >3 ganglios linfáticos axilares y ganglios linfáticos internos mamarios con micrometástasis o macrometástasis localizada mediante biopsia de ganglio linfático centinela pero sin detección clínica.
pN3c	Metástasis en ganglios supraclaviculares ipsilaterales.

* *Sin detección clínica*, se define como no localizable mediante estudios de imagen (excluyendo la linfoescintigrafía) o no localizable mediante exámenes clínicos.

** *Detectado clínicamente*, se define como localizable mediante estudios de imagen (excluyendo la linfoescintigrafía) o mediante examen clínico, o bien por tener características altamente sospechosas de una neoplasia o una presunta macrometástasis patológica basándonos en la realización de una biopsia de aspiración con aguja fina con examen citológico.

1.4.7.2.3 Clasificación postratamiento (ypN):

- La N postratamiento (ypN) se debería evaluar con métodos clínicos, como la N pretratamiento. El modificador "sn" solo se usa si se llevó a cabo una evaluación del ganglio centinela después del tratamiento. Si no se dice otra cosa, se asume que la evaluación del estado ganglionar axilar fue mediante linfadenectomía.
- Se usará la clasificación X (ypNX) si no reevaluó el estado ganglionar postratamiento.
- Las categorías N son las mismas que se usan para la pN.

1.4.7.3 METÁSTASIS A DISTANCIA (M)

M0	No hay prueba clínica o radiográfica de metástasis a distancia.
----	---

- cM0(i+) No hay prueba clínica o radiográfica de metástasis a distancia, pero sí detección de depósitos de células tumorales moleculares o microscópicas en la sangre circulante, médula ósea u otros tejidos ganglionares no regionales, que tienen ≤ 0.2 mm en pacientes sin signos o síntomas de metástasis.
- M1 Hay metástasis a distancia según lo determinan medios clínicos o radiográficos clásicos o se comprueba por medios histológicos que tiene >0.2 mm.

1.4.8 AGRUPACIÓN POR ESTADIOS

Estadio	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T0	N1mi	M0
	T1	N1mi	M0
IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
IIIC	Cualquier T	N3	M0
IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

1.5 FACTORES PRONÓSTICOS Y PREDICTIVOS

La aplicación generalizada de la terapia sistémica adyuvante ha reducido la mortalidad por cáncer de mama en el mundo occidental. Sin embargo, también es cierto que muchas pacientes reciben esta terapia con poca probabilidad de beneficio y una toxicidad sustancial. Sería de gran valor el poder disponer de un factor pronóstico fiable, que pudiera ayudar a seleccionar a las pacientes con más probabilidades de beneficiarse de la terapia adyuvante sistémica, evitando la posible toxicidad asociada a la misma y racionalizando el gasto (22, 23).

La evaluación patológica sistemática sigue siendo el elemento más importante en la determinación del pronóstico de los pacientes con cáncer de mama. Entre los factores pronósticos más potentes disponibles están: el estado de los ganglios linfáticos, el tamaño del tumor y el grado histológico, el tipo histológico del tumor y la invasión linfovascular (24-27).

1.5.1 FACTORES PRONÓSTICOS

En el documento de consenso de 1999 del Colegio Americano de Patólogos (24) los factores pronósticos se clasificaron en tres categorías: la categoría I incluye aquellos factores que proveen información en el manejo del paciente y que deben ser usados de manera rutinaria; la categoría II son factores biológicos y clínicos que han sido estudiados, pero que en los que todavía se necesita información estadística más sólida para ser validados y pueden ser opcionales; la categoría III la constituyen todos aquellos factores que no han sido totalmente estudiados para demostrar su valor pronóstico (Tabla 3).

Actualmente el oncogen Her2-neu, con el nivel de evidencia acumulada como factor predictivo, debe considerarse dentro de la categoría I (28-31).

La presencia o ausencia de estos factores nos permite clasificar a las pacientes en grupos de riesgo, para tener una mayor información sobre el pronóstico de la enfermedad y diseñar estrategias terapéuticas concretas (Tabla 4).

Tabla 3.- Factores pronósticos en el cáncer de mama. Consenso del Colegio Americano de Patólogos, 1999

CATEGORÍA I	CATEGORÍA II	CATEGORÍA III
Tamaño del tumor	HER 2-neu	Análisis de ploidía del DNA
Estatus ganglionar	P53	Angiogénesis
Grado histológico	Infiltración linfovascular	TGF-a
Tipo histológico	Marcadores de proliferación celular (Ki-67, MIB-1)	bcl-2
Expresión de receptores hormonales	Análisis de DNA (Fracción de Fase S)	pS2
		Catepsina D

Tabla 4.- Grupos de riesgo en pacientes con cáncer de mama y ganglios axilares negativos, en función de la presencia o ausencia de otros factores de riesgo. En: Goldhirsch A, 1998.

Grupos de riesgo en pacientes con cáncer de mama y ganglios axilares negativos			
	<i>Riesgo mínimo/bajo*</i>	<i>Riesgo intermedio**</i>	<i>Alto riesgo***</i>
Tamaño tumoral < 1 cm	1-2 cm	> 2 cm	
Estado RE y/o RP	Positivo	Positivo	Negativo
Grado histológico y/o nuclear	Grado 1	Grado 1-2	Grado 2-3
Edad	> 35 años	< 35 años	
* Tiene todos los factores de la lista			
** Riesgo clasificado entre las otras dos categorías			
*** Tiene al menos uno de los factores de la lista			

1.5.2 FACTORES PRONÓSTICOS CLÍNICOS

1.5.2.1 *Estadaje TNM*

El estadio del cáncer de mama es esencial en la evaluación del tumor y en la determinación del tipo de tratamiento. El cáncer de mama se clasifica sobre la base de la extensión anatómica de la lesión en cuatro estadios; cada estadio identifica un grupo de tumores que tienen aproximadamente un pronóstico similar (32).

El estadio del carcinoma es un importante factor pronóstico de la supervivencia (33) y su valoración es crucial en el tratamiento de las pacientes. Como se ha comentado más ampliamente en el punto 1.4, el estadaje puede ser clínico o anatomopatológico (15). El examen clínico debería incluir la evaluación del tamaño, movilidad y cambios asociados en la piel por el tumor primario, valoración del tamaño y movilidad de los ganglios linfáticos regionales y cualquier evidencia de metástasis a distancia.

El estadaje anatomopatológico requiere un examen exhaustivo de la pieza, desde el tumor primario hasta los ganglios axilares para confirmar la presencia del tumor y el tamaño de la lesión.

El estadio clínico y el patológico no siempre se correlacionan. Por ejemplo, los cambios inflamatorios en la piel de la mama no reflejan necesariamente invasión linfática dérmica (carcinoma inflamatorio), y la estimación clínica de la presencia o ausencia de afectación ganglionar es incorrecta en alrededor de un tercio de los casos.

El sistema de estadaje del cáncer de mama basado en una evaluación meticulosa del tumor primario (T), los ganglios linfáticos regionales (N), y las metástasis a distancia (M) fue inicialmente propuesto en 1954 por la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC) (34). Las varias combinaciones de las subcategorías de T, N, y M definen cuatro estadios que son designados como I, II, III, y IV en orden ascendente de gravedad. Como se ha comentado en el punto número 4, el sistema TNM de estadaje ha sufrido diversas revisiones desde su implantación (30, 35). La última de ellas tuvo lugar en 2010 y continúa en vigor hasta hoy (15).

1.5.2.2 *Edad*

De las características del paciente que se barajan como pronósticamente significativas, la edad es la única validada y se incluye en los factores que determinan grupos de riesgo, que son objeto de aproximaciones terapéuticas diferenciadas (Tabla 4) (36).

Casi todos los estudios sugieren que las mujeres jóvenes con cáncer de mama, particularmente de menos de 35 años, tienen más probabilidades de que a su enfermedad se

le asocien factores pronósticos negativos, generalmente condicionando peores resultados (37-39).

1.5.2.3 *Obesidad*

Existe evidencia contrastada de que la obesidad afecta de manera adversa a la salud de la mujer. La obesidad, además, es un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de mama y también afecta de manera negativa a la supervivencia en las mujeres que ya han sido diagnosticadas de cáncer de mama (40-44). Entre los posibles mecanismos por los cuales la obesidad empeora el pronóstico del cáncer de mama se encuentran:

- Actividad estrogénica más elevada
- Una enfermedad más avanzada o más agresiva en el momento del diagnóstico
- Elevada probabilidad de fracaso al tratamiento local y sistémico

1.5.2.4 *Gestación*

El cáncer de mama constituye la enfermedad maligna más frecuente en el embarazo, con una frecuencia de 1: 3.000 - 10.000 gestaciones (45). El retraso en el diagnóstico y tratamiento puede ser el responsable de los estadios más altos de los carcinomas de mama asociados a embarazo en el momento de su presentación; además, alrededor de un 70% de estos carcinomas son RE- proporcionando una adicional evidencia sobre el hecho de que los carcinomas de mama asociados a embarazo tienden a ser más agresivos (46-48).

1.5.3 FACTORES PRONÓSTICOS HISTOLÓGICOS

1.5.3.1 *Estado de los ganglios axilares*

El estado de los ganglios axilares (Tabla 3, Tabla 4) se ha demostrado repetidamente como el factor único más importante para predecir la supervivencia global y libre de enfermedad en los pacientes con cáncer de mama (24, 49). El 70% de los pacientes con ganglios axilares positivos recidivarán a los 10 años mientras que, en los pacientes con ganglios axilares negativos, el porcentaje de recidivas se reduce a un 20-30%.

El número de ganglios afectados es también pronósticamente muy significativo (Tabla 5). Para poder establecer con seguridad el estado de los ganglios axilares mediante la linfadenectomía axilar clásica es necesario examinar un número suficiente de ganglios. Las investigaciones dirigidas a dilucidar esta cuestión indican que se deben obtener al menos 10

ganglios de la axila para definir el estado ganglionar, especialmente si éste resulta negativo (50-52).

Tabla 5.- Mortalidad específica por cáncer de mama (%) a los 5 años en función de la afectación ganglionar, según datos del SEER.

Mortalidad específica por cáncer de mama (%) a los 5 años (SEER)			
Tamaño cm (T)	0 N+	1-3 N+	>3 N+
< 0.5	0.8	4.7	41.0
0.5-0.9	1.7	6.0	45.8
1.0-1.9	4.2	13.4	32.8
2.0-2.9	7.7	16.6	36.6
3.0-3.9	13.8	21.0	43.1
4.0-4.9	15.4	30.2	17.4
> 5	17.8	27.0	54.5

La presencia de metástasis tumoral en los ganglios de la mamaria interna se asocia con una peor supervivencia. Las perspectivas son particularmente amenazadoras en las pacientes que tienen metástasis tanto en los ganglios axilares como en los de la mamaria interna (53, 54).

La afectación de los ganglios supraclaviculares tiene aún peor pronóstico, ya que estos ganglios son generalmente alcanzados después de la invasión de los ganglios axilares o de los de la mamaria interna (55).

La estadificación axilar, a través de la evaluación patológica del primer ganglio de drenaje del área tumoral (biopsia del ganglio centinela), se ha desarrollado para evitar el vaciamiento ganglionar axilar en pacientes con axila negativa (56, 57). En los últimos años ha demostrado ser una técnica sensible y específica para predecir el estado ganglionar (58, 59). El valor predictivo del ganglio centinela sobre el estado axilar ha sido muy alto en casi todas las series publicadas y han sido muy escasos los falsos negativos (60, 61).

1.5.3.2 *Tamaño tumoral*

Es el factor pronóstico más importante tras la afectación ganglionar (Tabla 3, Tabla 4), y es un factor predictivo de la presencia de metástasis axilares, tasas de recidiva y supervivencia, incluso dentro del grupo de tumores de menor tamaño T1 (62, 63). Es además un ítem importante para su clasificación TNM y para la selección del tratamiento adyuvante. El tamaño tumoral y la presencia o no de metástasis axilares son factores pronósticos independientes y aditivos (36, 64).

El tamaño del tumor debe ser medido al menos en dos dimensiones y la mayor es la utilizada para la estadificación (T). El tamaño debe verificarse microscópicamente, prevaleciendo, en caso de discrepancia, la medida microscópica del componente invasivo (24).

1.5.3.3 *Grado histológico*

El grado histológico también es reconocido como un factor pronóstico importante, aunque no sea utilizado como parámetro en la clasificación TNM (Tabla 3, Tabla 4) (65), y su utilidad como un indicador de la agresividad tumoral ha ganado aceptación progresivamente, al tiempo que han estado disponibles técnicas específicas y consistentes para su determinación con resultados reproducibles. Los carcinomas de bajo grado se asocian a un mejor pronóstico que los de alto grado.

Tabla 6.- Mortalidad específica por cáncer de mama (%) a los 5 años en función del estadio TNM y el grado histológico, según datos del SEER.

<i>Mortalidad específica por cáncer de mama (%) a los 5 años según TNM y grado histológico (22.616 casos, base de datos del SEER)</i>					
<i>TNM</i>	<i>GI</i>	<i>GII</i>	<i>GIII</i>	<i>GIV</i>	<i>Todos</i>
N (-), T<2 cm	1	2	6	11	4
N (-), T=2-5 cm	3	9	16	14	12
N (+), T<2 cm	1	11	21	19	16
N (-), T=2-5 cm	15	21	35	37	30
N (-): ganglios axilares negativos ;; N(+): ganglios axilares positivos					

La importancia del grado de diferenciación tumoral en el cáncer de mama es un hecho que ha sido demostrado en numerosos estudios (66-69) como factor predictivo de metástasis a distancia y peor supervivencia global en pacientes con tumores poco diferenciados, independientemente de otros factores pronósticos, como el tamaño tumoral o el status de los ganglios axilares (Tabla 6). Algunas evidencias sugieren que además de ser un factor pronóstico, el grado de diferenciación puede ser un factor predictivo de respuesta a la quimioterapia, utilizándose para tomar decisiones de tratamiento adyuvante (70). La combinación del tipo histológico y del grado, proporciona una mejor estimación del pronóstico, que el grado histológico sólo.

Las recomendaciones del ACP para estandarizar la información sobre el grado histológico señalan que todos los carcinomas de mama, excepto el carcinoma medular, deben ser clasificados con un grado histológico y que el sistema utilizado debe ser especificado en el informe, aconsejándose el grado histológico combinado de Nottingham (modificación de Elston-Ellis del sistema de Scarff-Bloom-Richardson) (24, 71, 72). Este sistema de gradación combina la evaluación arquitectural (formación de túbulos), el grado de atipia nuclear y el recuento de figuras de mitosis. A cada uno de los conceptos se le asigna una puntuación de 1-2-3. El resultado final es una puntuación de 3-9 que nos dará el grado final siguiendo la siguiente fórmula: Grado I: 3-5 puntos; Grado II: 6-7 puntos, y Grado III: 8-9 puntos. La utilidad de este sistema ha sido probada extensamente, de manera que es una información que debe constar, de forma rutinaria, en el informe anatomopatológico.

1.5.3.4 Tipo histológico

En general, el carcinoma de mama se ha dividido en tipos con pronóstico favorable y desfavorable. Dentro del primer grupo se consideran el carcinoma medular, tubular, mucinoso y adenoide quístico, los cuales son tumores con baja incidencia de metástasis ganglionares. En la mayoría de las series estos tumores se asocian a características favorables tales como bajo grado de malignidad o negatividad axilar. En el segundo grupo se incluyen el carcinoma pobremente diferenciado, de células en anillo de sello, carcinoma metaplásico y carcinosarcoma (10, 11).

Los carcinomas lobulillares clásicos (alrededor del 4% de los carcinomas invasivos) y los carcinomas medulares típicos -particularmente con axila negativa-, tienen también mejor pronóstico que los carcinomas invasivos habituales y que otros subtipos de carcinomas lobulillares invasivos.

A pesar de su importancia como factor pronóstico (Tabla 3), el tipo histológico no influye en la estadificación de la neoplasia.

1.5.3.5 Índice Pronóstico de Nottingham (NPI)

El modo de integrar todos estos factores pronósticos, para poder tomar decisiones terapéuticas en las pacientes con cáncer de mama, es por el momento un tema sin resolver.

Se han desarrollado algunos índices pronósticos, combinando varios de los factores expuestos, como el Índice pronóstico de Nottingham (73), que utiliza el tamaño tumoral, el estatus de los ganglios linfáticos axilares y el grado histológico [IPN = 0,2 x tamaño tumoral (cm) + estadio de los ganglios linfáticos (1, 2, 3) + grado tumoral (1, 2, 3)], para elaborar un índice que permite estratificar a las pacientes en grupos de pronóstico bueno, intermedio y malo, con unas tasas de mortalidad anual del 3%, 7% y 30% respectivamente. Su consistencia como factor pronóstico independiente se ha demostrado en una serie de más de 2.600 pacientes con cáncer de mama (74). Además, también se ha evaluado recientemente en tumores de menos de 1 cm en una serie de 318 mujeres, comprobándose la relevancia del IPN para pequeños tumores (75).

El menor valor del IPN se asocia al mejor pronóstico.

1.5.3.6 Invasión linfovascular

La valoración de la invasión de vasos linfáticos mediante métodos histológicos convencionales es un método reproducible, con una concordancia inter-observador del 85%, que se correlaciona estrechamente con la afectación de los ganglios linfáticos loco-regionales y, por lo tanto, proporciona información pronóstica del estadio ganglionar, especialmente en pacientes con tumores T1N0, en los que la infiltración vascular permite identificar a un subgrupo de pacientes, con mayor probabilidad de metástasis axilares y metástasis a distancia (76, 77). Otra aplicación importante de la afectación vascular linfática en el carcinoma infiltrante de mama es que resulta un potente predictor de recurrencia local tras tratamiento quirúrgico conservador y tras mastectomía (24, 78, 79). En el último consenso de St. Gallen se incluyó como factor pronóstico para la selección del tratamiento adyuvante (80).

1.5.3.7 Otros factores histológicos no validados con posible valor pronóstico

1.5.3.7.1 Necrosis tumoral

No está claro si la presencia de necrosis en los carcinomas infiltrantes de mama se debe considerar como un factor de peor pronóstico, a pesar de que existen estudios que la asocian con peor supervivencia y recaídas precoces. Esto se debe a que con frecuencia los tumores asociados a necrosis muestran también alto grado histológico. Se necesitan estudios con análisis multivariante, que permitan saber si la necrosis es un factor pronóstico en el

carcinoma infiltrante de mama, y si es así, establecer la extensión de la necrosis que tendría importancia pronóstica (81).

1.5.3.7.2 Infiltración perineural e infiltrado inflamatorio tumoral

La invasión perineural se asocia con frecuencia a la invasión de vasos linfáticos, pero no ha sido demostrado, que se comporte como un factor pronóstico independiente (81) y lo mismo ha ocurrido con la inflamación intratumoral.

1.5.3.7.3 Angiogénesis

No se ha podido demostrar en todos los estudios que una mayor densidad vascular tenga un peor pronóstico, mayor incidencia de metástasis o disminución de la supervivencia (24, 81). Sin embargo, varios estudios demuestran un peor pronóstico, si se demuestra con técnicas de inmunohistoquímica una alta expresión de los factores de crecimiento de células endoteliales VEGF-D y VEGF-C y de su receptor VEGFR-3 (82).

1.5.3.7.4 Micrometástasis en la médula ósea

No están bien establecido el valor pronóstico de las micrometástasis en la médula ósea en el cáncer de mama (83-85), si bien con las técnicas de inmunohistoquímica y biología molecular se ha demostrado la presencia de células mamarias malignas en un alto porcentaje de casos.

1.5.4 FACTORES PRONÓSTICOS BIOLÓGICOS Y MOLECULARES

1.5.4.1 Receptores esteroideos (RE y RP)

Las determinaciones de los receptores esteroideos (RE y RP) (Tabla 3, Tabla 4) son procedimientos establecidos como rutinarios para el manejo de las pacientes con cáncer de mama (24).

Mientras que el valor predictivo de la expresión del receptor de la hormona es bien aceptado, su importancia pronóstica ha sido un tema de debate desde hace muchos años.

Las mujeres con cáncer de mama en estadio I RE-positivo que no reciben terapia sistémica después de la cirugía tienen un riesgo de 5 a 10 por ciento más bajo de recurrencia a los cinco años que aquellas que tienen tumores RE-negativos (86-88) . Sin embargo, a medida que aumenta el tiempo de seguimiento, la ventaja de la positividad para RE en términos de recaída y la muerte se hace más pequeña y, finalmente, desaparece (89, 90). Esto podría reflejar un mejor efecto de las terapias secuenciales de quimioterapia adyuvante, que

beneficiaría en mayor medida a las pacientes con tumores con receptores hormonales negativos.

La expresión de los receptores hormonales se asocia con otros indicadores de pronóstico bien establecidos, pero no con las metástasis ganglionares. Por lo tanto, los RE y RP pueden ser mejores marcadores de la tasa de crecimiento que del potencial metastásico tumoral (91-93).

Los tumores RE positivos son más propensos a ser histológicamente bien diferenciados, a tener una fracción menor de células en división y a ser diploides (94-96). También tienen menos probabilidad de estar asociados con mutaciones, pérdida o amplificación de genes relacionados con el cáncer de mama, tales como p53, HER2, o HER1 (receptor del factor de crecimiento epidérmico [EGFR]) (95, 97-99), todos los cuales se han asociado con un peor pronóstico.

El estado del receptor hormonal también se asocia con lugares específicos de diseminación metastásica. Por razones poco claras, los tumores RE positivos son más propensos a desarrollar metástasis clínicamente aparentes en los huesos, tejidos blandos, o en el aparato reproductivo; por el contrario, los tumores RE-negativos metastatizan con más frecuencia en el cerebro y el hígado, los sitios que están asociados con menor supervivencia (100).

1.5.4.2 *Her2-neu*

La activación de oncogenes celulares o c-oncogenes y/o la pérdida de función de genes supresores pueden jugar un papel importante en la formación de cánceres humanos. El oncogén Her2-neu codifica una glucoproteína trans-membrana de 185 KD con actividad intracelular tirosina kinasa. Pertenece a la familia de los factores de crecimiento epidérmicos que son fundamentales en la activación de señales intracelulares y controlan el crecimiento y la diferenciación celular epitelial. La familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) consta de cuatro miembros, designados de c-erbB-1 a c-erbB-4. De estos, el Her2-neu (también denominado cErbB-2) ha sido extensamente estudiado como biomarcador en el cáncer de mama. Así, se ha detectado que aproximadamente de un 20 a un 40% de los cánceres de mama tienen amplificado y/o sobreexpresado el proto-oncogén Her2-neu (101-103).

La amplificación del ADN del Her2-neu se ha correlacionado con peor pronóstico y predice mejor que la expresión de la proteína correspondiente (104-106). Según otros autores, la expresión de la oncoproteína erb-B2 ayuda a predecir de forma independiente el pronóstico (107). Las pacientes que sobreexpresan el erbB2 son, además, candidatas a tratamiento con trastuzumab (Herceptina) (108, 109). La sobreexpresión de C-erbB-2/Her-

2/neu se debe determinar en cada tumor nuevamente diagnosticado, sobre cada recurrencia o sobre tumores resistentes al tratamiento (110). Su positividad distingue un subgrupo en el que el beneficio de las antraciclinas es mayor, aunque su negatividad no excluye la posibilidad de recibir tal tratamiento (111).

1.5.4.3 Marcadores de proliferación celular

1.5.4.3.1 Catepsina D

La catepsina D es producida y secretada por las células cancerosas mamarias. Es uno de los últimos marcadores que están siendo actualmente evaluados como indicador pronóstico, a pesar de que la ASCO, en las recomendaciones para el uso de los marcadores tumorales en el cáncer de mama del 2007 no recomienda su uso rutinario (110). Su sobreexpresión parece estar asociada con una conducta tumoral agresiva y una supervivencia libre de enfermedad acortada (112, 113).

La relación de la catepsina D con la proteína Her2-neu y con la amplificación del oncogen c-myc fue estudiada por Brouillet y cols. (114) y determinaron que la catepsina D no se correlaciona con la expresión del oncogen HER-2, pero sí con la amplificación del oncogen c-myc. La expresión de c-myc está generalmente relacionada con la proliferación celular, resultando que las pacientes en las que el ADN del tumor muestra un c-myc amplificado tienen un periodo de supervivencia acortado (115).

1.5.4.3.2 Ki 67

El antígeno Ki 67 identifica las células proliferantes dentro de un tumor, y por tanto cuanto mayor es su presencia, más agresivo es el tumor. La positividad del Ki 67 se correlaciona con el grado de diferenciación tumoral, invasión vascular, metástasis en ganglios linfáticos, y se relaciona inversamente con la presencia de receptores hormonales (116-118)

1.5.4.3.3 p53

El gen p53 se localiza en el cromosoma 17 y se considera un regulador negativo del crecimiento celular. Sus mutaciones constituyen la alternativa genética más frecuente en neoplasias malignas. La mutación de p53 se considera un factor de mal pronóstico por determinar pérdida de la función supresora, activación del crecimiento celular y aumento del riesgo de progresión de la neoplasia (119, 120). La forma mutante de la proteína p53 se acumula en el núcleo celular, donde puede detectarse por técnicas de inmunohistoquímica sobre tejido incluido en parafina (117, 121, 122).

1.5.4.3.4 Cinética celular

Como parámetro pronóstico, el análisis de la cinética celular de los carcinomas de mama tiene la ventaja de ser cuantificable, objetivo, independiente del estado de los ganglios axilares y aplicable a las pacientes ganglio-negativas. Esta característica puede ser evaluada por medio de marcaje con Timidina o por análisis del ADN por citometría de flujo (123). El índice de marcaje con Timidina (IMT) indica la proporción de células que están en la fase S dentro del tumor. En general, los carcinomas de bajo grado, tienen un IMT bajo, mientras que los carcinomas con IMT alto tienen un potencial para crecer rápidamente y recidivar precozmente (124). El IMT se correlaciona poco con el estadio clínico del tumor, inversamente con el contenido de receptores estrogénicos y es directamente proporcional al grado histológico (125, 126).

Las células en fase S también pueden ser identificadas utilizando la citometría de flujo (127). La fracción de la fase S (FFS) determinada por citometría de flujo es considerada generalmente equivalente al IMT. Además de proporcionar el valor de la FFS, la citometría de flujo puede también hacer un cálculo del índice de ADN, comparando el contenido de ADN de las células tumorales con el de las células benignas. Ambos parámetros se cuantifican en la misma determinación (128). En comparación con el IMT, la citometría de flujo proporciona un análisis más objetivo y más rápido de la cinética celular, además de poder ser también determinada la ploidía del tumor, incluso de otros parámetros con la única limitación de que los diferentes marcadores usados puedan conjugarse con diferentes fluorocromos que puedan leerse en el citómetro disponible en diferentes detectores y sin interferencias entre ellos o que dichas interferencias puedan corregirse electrónicamente (129).

La citometría de flujo se puede realizar en diferentes tipos de tejidos, con el único requerimiento de que se puedan obtener células en suspensión, por tanto se puede realizar incluso en tejido incluido en parafina, permitiendo poder realizar estudios retrospectivos de material archivado (130). Sin embargo, los tejidos incluidos en parafina han sido previamente fijados y con frecuencia esta fijación incluye formaldehidos que dificultan la entrada del colorante al ADN. Es por eso que tanto el cálculo de la fase de síntesis como del índice de ADN son poco precisos en muestras de tejido desparafinado y es mucho más aconsejable el uso de tejido fresco o congelado (131).

A pesar de que se ha comprobado que la ploidía celular y la FFS son importantes indicadores pronósticos que pueden ayudar a seleccionar pacientes que puedan beneficiarse de un tratamiento sistémico, la actualización de las recomendaciones para el uso de los marcadores tumorales en el cáncer de mama de la ASCO 2007 (110) no recomienda su uso rutinario ni la creación de grupos pronóstico basándose en estos parámetros. En sus justificaciones, aduce la gran cantidad de estudios en relación al tema pero con un tamaño

muestral pequeño y con procedimientos metodológicos dispares (material fresco/material incluido en bloques de parafina, puntos de corte diversos...). Para tratar de evitar esta variabilidad, la Conferencia de Consenso sobre la Utilidad Clínica de la Citometría de Flujo en el Cáncer de Mama (131-133) realizó unas recomendaciones con el fin de unificar criterios y conseguir que los resultados de los estudios fueran comparables.

A pesar de que el estudio de la cinética celular mediante la cuantificación de ADN por citometría de flujo se planteó desde sus inicios como una técnica muy prometedora, está tardando en ser usada como habitual en laboratorios de Anatomía Patológica y sigue siendo mucho más utilizada en trabajos de investigación. Sin embargo, puede que esto sea así más por cuestiones ajenas a su supuesta utilidad.

1.5.5 FACTORES PREDICTIVOS

Se considera *factor predictivo* a cualquier valor asociado al grado de respuesta a un tratamiento específico. En el cáncer de mama temprano los factores predictivos pueden ser - por su peso a la hora de decidir el tratamiento adyuvante- más útiles clínicamente que los factores pronósticos, pero su detección es compleja, pues requieren ensayos clínicos exigentes para su evaluación y validación: randomizados, con gran número de casos para dotarlos de suficiente poder estadístico, y partiendo de protocolos estandarizados para la detección y cuantificación del factor.

1.5.5.1 Receptores de hormonas esteroideas (RE y RP)

La decisión de recomendar a una paciente con cáncer de mama tratamiento hormonal adyuvante debe basarse en la presencia de receptores hormonales. De hecho, el estado de receptores para hormonas esteroideas (RE y RP) en el tumor primario es el único marcador de respuesta al tratamiento que tiene inequívoca utilidad clínica (24).

La mayoría de los laboratorios han determinado arbitrariamente el 10-20% de células tumorales positivas como el punto de corte para definir la positividad de los RE. Sin embargo, algunos autores sugieren que pacientes cuyos tumores contienen hasta el 1% de células débilmente positivas mejoran significativamente en la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global si son tratados con tamoxifeno (134). En el tejido mamario el tamoxifeno actúa como un antiestrógeno, inhibiendo la unión del estrógeno a los RE y, de esta manera, la proliferación de las células tumorales RE-positivas.

Más de 37.000 mujeres con cáncer de mama operable participaron, antes de 1990, en 55 ensayos clínicos randomizados con tamoxifeno adyuvante, aportando una gran base de datos de hallazgos en el seguimiento a largo plazo (135). Cuando todas las mujeres y todas las

duraciones del tratamiento fueron incluidas en el análisis, el tamoxifeno se encontró asociado a una reducción significativa en el número de recidivas y de muertes después de un seguimiento medio de alrededor de 10 años (136). La reducción anual de recidivas y muertes fue del 26 y 14%, respectivamente. Esto significa que cada año, una de cada cuatro recidivas y una de cada seis muertes pueden ser retrasadas o evitadas con el tamoxifeno.

Este beneficio en el control de la enfermedad y en la mortalidad, derivado del tratamiento con tamoxifeno, se limita a las pacientes con tumores positivos para los RE y/o RP, lo que confiere al estado de los receptores hormonales en los tumores mamarios la validez inequívoca como factor predictivo. Los beneficios se incrementan cuando se aumenta la duración del tratamiento hasta cinco años, resultando el tamoxifeno de esta manera en una reducción anual del 50% en la tasa de recidivas y del 28% en la tasa de muertes (137-139). Entre mujeres con tumores RE-positivos, la eficacia del tamoxifeno fue independiente de la concentración de RP en el tejido tumoral. Entre las mujeres con tumores RE-negativos, aquellas cuyos tumores contenían RP se beneficiaban también del tamoxifeno (140).

La privación de estrógenos también puede conseguirse eliminando su síntesis farmacológicamente -en la mujer postmenopáusica a través de la administración de inhibidores de la aromatasas y en la pre-menopáusica con agonistas de la LHRH- o con la ablación ovárica quirúrgica o radioterápica.

En definitiva, el tratamiento hormonal debe ser recomendado a las mujeres cuyos cánceres de mama contienen proteína RE y/o RP, independientemente de la edad, del estado menopáusico, de la afectación de los ganglios axilares y del tamaño tumoral (141, 142). Posibles excepciones a estas recomendaciones incluyen mujeres premenopáusicas con tumores menores de 10 mm que deseen evitar los síntomas de la privación estrogénica o mujeres ancianas, con cánceres similares que tengan antecedentes de episodios de TVP (143).

1.5.5.2 Her2-neu

Los primeros estudios que examinaron el papel potencial del estado del Her2-neu para predecir la utilidad de la quimioterapia adyuvante, se centraron en regímenes que contenían ciclofosfamida, metrotexato y fluoruracilo (CMF) (144, 145). Estos estudios, y otros posteriores, encontraron que las pacientes cuyos tumores tenían un nivel bajo o indetectable de Her2-neu se beneficiaban considerablemente de los tratamientos quimioterápicos tipo CMF, mientras que las pacientes cuyos tumores tenían amplificado en gen Her2-neu, o sobreexpresaban su proteína, no obtenían ganancia de estos tratamientos.

Teniendo en cuenta los datos disponibles hasta la actualidad los tumores Her2-neu positivos, más que resistentes a la quimioterapia, serían sensibles, e incluso hipersensibles, a los tratamientos adyuvantes basados en la adriamicina (146-148).

La evidencia actual sugiere que para la mayoría de los pacientes Her2-neu positivos, con cánceres de mama para los que esté indicada la quimioterapia adyuvante, son apropiados esquemas terapéuticos que contengan una antraciclina (149, 150). Sin embargo, son necesarios estudios prospectivos para determinar inequívocamente que la positividad del Her2-neu permite seleccionar regímenes específicos de quimioterapia.

1.5.5.3 Otros biomarcadores

Varios biomarcadores, además de los anteriormente reseñados, han sido propuestos como factores predictivos para la hormonoterapia -pS2, EGFr, TGFa, marcadores de proliferación (fracción en fase S, Ki67/MiB1, PCNA, TLI), factores de metástasis (uPA, PAI-1)- y para la quimioterapia -p53, bcl2, marcadores de proliferación, proteínas del shock por calor o de choque térmico-. Se han publicado resultados positivos con todos ellos que los hacen prometedores para el futuro, sin embargo están lejos de ser de utilidad clínica en la actualidad y su validación requiere estudios adicionales (110).

1.6 DE LA CIRUGÍA CLÁSICA A LA CONSERVADORA. EL CONCEPTO DE GANGLIO CENTINELA

En la historia de la Medicina se han desarrollado tres modelos conceptuales sobre la naturaleza del cáncer de mama. Desde el año 200 D.C. hasta el siglo XIX la enfermedad se manejaba según los principios de Galeno, viéndose como un exceso de melancolía, bilis negra, que se coagulaba en la mama. La consecuencia terapéutica de esta creencia era librarse del exceso de bilis negra con aplicación de ventosas, sanguijuelas, purgas, enemas o dietas.

A finales del siglo XIX se produjo una revolución en estas teorías. Una vez descrita la anatomía de la mama y de los canales linfáticos, y acordada la naturaleza celular del cáncer, se describía la enfermedad como un fenómeno local en la mama que luego se expandía a lo largo de los ganglios linfáticos. De esta hipótesis derivó el desarrollo de la mastectomía radical de Halsted como terapéutica de elección. Este tratamiento y sus bases teóricas se mantuvieron como dogma hasta hace 25 años, aproximadamente. De esta base conceptual surgió también la idea de que el cáncer de mama, si se diagnostica de manera precoz, puede curarse, lo que implicó el desarrollo de medios para el diagnóstico precoz de la enfermedad, con lo que comenzaron a detectarse pequeñas lesiones palpables e incluso lesiones preclínicas no palpables, que han contribuido al conocimiento progresivo de la enfermedad.

Gracias a los trabajos del Profesor Bernard Fisher de la Universidad de Pittsburg a finales de 1960 (151), la evolución de la enfermedad se considera predeterminada por la

diseminación de células tumorales por los microvasos del tumor en etapas precoces de su historia natural. Es la denominada teoría de la *predeterminación biológica*. Un cáncer de mama, aunque se trate de un tumor pequeño, nunca se podrá considerar precoz. La fase preclínica de su desarrollo significa que habría existido tiempo suficiente para su diseminación y, por consiguiente, el resultado del tratamiento estaría determinado por el grado de diseminación microscópica antes del diagnóstico.

Por tanto el concepto locorregional de esta enfermedad ya ha sido superado, y el cáncer de mama se aborda hoy en día como una enfermedad sistémica que desde las primeras etapas de su desarrollo se podría diseminar de una forma no ordenada, lo que explica el fracaso de los tratamientos locales aislados. La teoría de Fisher también pone de manifiesto que la cirugía radical, realizada hasta ese momento, podría no ser eficaz en términos de supervivencia y que, teniendo en cuenta que la diseminación metastásica se produce a menudo a través del flujo sanguíneo, una resección linfática muy amplia, como la realizada hasta entonces, podría resultar inútil. Las implicaciones terapéuticas de esta teoría conllevan la administración de tratamientos médicos sistémicos, destinados a destruir las células tumorales en cualquier localización del organismo, como la terapia adyuvante (152). Desde la cirugía local o locorregional, este paso ha demostrado ser el de mayor impacto en el descenso de la mortalidad desde que se conoce la enfermedad ya que la diseminación metastásica es la primera causa de muerte por cáncer de mama (153).

En 1994, Samuel Hellman comunicó una hipótesis alternativa, la denominada *Teoría Espectro*, según la cual el cáncer de mama constituye una enfermedad heterogénea en su evolución, que varía desde ser una enfermedad local en su desarrollo hasta resultar una enfermedad sistémica desde el inicio (154). Las metástasis están en función del crecimiento y de la progresión tumoral y la afectación linfática tendría gran importancia pronóstica, ya que indicaría una biología más agresiva del tumor y porque la presencia en los ganglios linfáticos de la enfermedad podría ser fuente de enfermedad a distancia. Además, como ya se ha comentado, se ha evidenciado una relación lineal entre el tamaño del tumor, la afectación ganglionar axilar y la supervivencia.

1.6.1 CIRUGÍA RADICAL VS CIRUGÍA CONSERVADORA

Siguiendo la teoría de Halsted de que el cáncer de mama era una enfermedad local desde el inicio y que, por tanto, detectándola precozmente era potencialmente curable con cirugía, a lo largo de la historia se diseñaron diversas técnicas quirúrgicas para realizar la extirpación mamaria reglada, tratando de ser lo más radical posible, ya que radicalidad era sinónimo de potencial curación.

Surgieron así técnicas de mastectomía clásica, como la propia mastectomía radical de Halsted y Meyer (155), consistente en la extirpación de la glándula mamaria, ambos pectorales y el vaciamiento axilar completo. La incisión empleada era vertical y los resultados estéticos, pésimos. La mastectomía radical ampliada añadía a la anterior la extirpación de los ganglios de la mamaria interna, y la superradical añadía a su vez la disección de los ganglios supraclaviculares, bien de forma discontinua o en monobloque extirpando parte de la clavícula y de la primera y segunda costillas. Como ejemplo de extremismo en la radicalidad quirúrgica, la mastectomía superradical de Prudente asociaba una desarticulación interescapulotorácica del brazo homolateral (156).

Patey (157) introdujo una variante en la mastectomía radical de Halsted, consistente en la extirpación de la glándula mamaria con el pectoral menor y la fascia del pectoral menor, con vaciamiento axilar completo. Madden (158), por su parte, también planteó otra modificación de la técnica clásica, en la que se extirpaba la glándula mamaria, respetando ambos pectorales, con vaciamiento axilar completo. Son estas dos últimas técnicas, las mastectomías radicales modificadas de Patey y Madden, las únicas técnicas radicales con utilización en la actualidad (156).

La introducción de técnicas de diagnóstico precoz de lesiones mamarias potencialmente malignas ha favorecido el diagnóstico de cánceres de mama en estadios más iniciales, por lo que las técnicas quirúrgicas radicales se han cuestionado en estos casos y se han iniciado estudios comparando la supervivencia de pacientes con cáncer de mama en estadios I y II tratadas con cirugía conservadora (tumorectomía, cuadrantectomía) respecto a aquellas sometidas a cirugía radical (159). En 1969 la OMS autorizó al Instituto de Tumores de Milán a iniciar un estudio multicéntrico randomizado en el que se compararon la mastectomía clásica de Halsted y un tratamiento conservador de la mama, consistente en cuadrantectomía de la zona donde asentaba el tumor asociado a radioterapia complementaria. Los resultados, publicados en 1981, indicaron que el tratamiento conservador de la mama más la disección axilar y radioterapia eran semejantes a los obtenidos mediante la mastectomía tipo Halsted (160). Estos grupos de trabajo publicaron sus resultados tras 20 años de seguimiento (Tabla 7), observando que la supervivencia es igual en las dos modalidades de tratamiento y las recurrencias locales en el tratamiento conservador oscilan entre el 9 y el 14 % (161-165).

En la actualidad, la importancia del tratamiento locorregional está ligada al estadio de la enfermedad: si ésta ya se encuentra diseminada por el organismo, este tratamiento regional no pretenderá tener un carácter curativo, y habrá que dar prioridad a los tratamientos sistémicos. Si, por el contrario, el cáncer parece limitado a la mama y no ha sobrepasado las primeras barreras ganglionares, la cirugía y radioterapia permiten un control local satisfactorio y la exéresis quirúrgica proporciona una posibilidad de curación razonable

(166). Se propondrá posteriormente tratamiento sistémico si existen posibilidades de difusión metastásica oculta.

Tabla 7.- Estudios prospectivos aleatorizados comparando la supervivencia de pacientes en estadios I y II de cáncer de mama con cirugía conservadora + radioterapia y mastectomía. (Modificado de Ramos Boyero M, 2004).

	<i>Pacientes (nº)</i>	<i>Tto. Sistémico</i>	<i>Seguimiento (años)</i>	<i>Supervivencia (%) Tto. Conservador</i>	<i>Mastectomía</i>	<i>Recurrencia Local</i>
NSABP-B-06 (Fisher et al.)	1217	SI	20	46	47	14
NCI – Milán (Veronesi et al.)	701	SI	20	74	76	9
Instituto Gustave-Roussy	179	NO	10	78	79	7
Danish Breast Cancer Group	905	SI	6	79	82	4
EORTC (Bartelink et al.)	903	¿?	8	71	73	13

1.6.2 IDENTIFICACIÓN DE LA AFECTACIÓN GANGLIONAR AXILAR: EL CONCEPTO DE GANGLIO CENTINELA

Como hemos señalado anteriormente, el tamaño tumoral y la afectación de los ganglios linfáticos a nivel locorregional constituyen los dos factores pronósticos más importantes de esta enfermedad (24), contribuyendo a predecir tanto la supervivencia libre de enfermedad como la supervivencia global de las pacientes con cáncer de mama, y en ellos se basan en gran medida las decisiones clínicas y terapéuticas en estas pacientes. Ambos factores contribuyen de forma notable a la predicción de las recaídas; por eso en la actualidad las mujeres con células tumorales detectables en la axila reciben quimioterapia y radiación en las cadenas ganglionares (> 3 ganglios metastásicos), después de la cirugía (167, 168).

Desafortunadamente, aún no existe ninguna técnica complementaria que pueda suplir a la exéresis quirúrgica y la visión directa de los ganglios linfáticos axilares para identificar las posibles células metastásicas en los mismos. El estudio anatomopatológico de los ganglios axilares es, por tanto, el dato clínico objetivo más importante sobre el que basar

una predicción pronóstica y proporcionar una base objetiva para la administración de los tratamientos adyuvantes (24).

Para la realización de la linfadenectomía axilar (52) se puede dividir el tejido linfograso axilar en 3 niveles (Niveles de Berg), tomando como referencia el músculo pectoral menor (Figura 5):

- Nivel I: por fuera del borde externo del músculo pectoral menor
- Nivel II: por debajo del músculo pectoral menor
- Nivel III: desde el borde interno del pectoral menor hasta la aponeurosis costoclavicular.

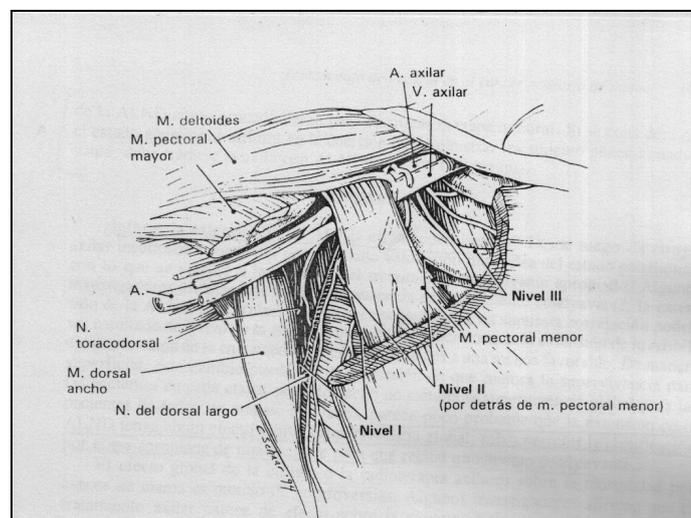


Figura 5.- Esquema anatómico de los niveles de Berg para la disección axilar. En: Petrek J et al, 1995.

Como se ha comentado, la exactitud diagnóstica de la linfadenectomía axilar tiene que ver con el número de ganglios extirpados. Está consensuado que para el diagnóstico cualitativo de invasión axilar se debe realizar una extirpación mínima de 10 ganglios (50-52).

La linfadenectomía axilar es una técnica no exenta de complicaciones tanto intra como postoperatorias. La presencia de linfedema crónico del miembro superior, directamente relacionada con la linfadenectomía del nivel III de Berg, así como lesiones neurológicas que dejan secuelas sensitivo-motoras en dicho miembro son las más frecuentes (169, 170). Por otro lado, dado que los nuevos medios diagnósticos facilitan el diagnóstico de tumores en etapas cada vez más precoces, en muchas ocasiones los ganglios axilares obtenidos en la linfadenectomía axilar no presentan infiltración metastásica. Por este motivo algunos autores cuestionan la necesidad de una linfadenectomía axilar sistemática en estadios tumorales

precoces (estadios I y II). El conocimiento que hemos ido adquiriendo sobre los mecanismos de extensión de la enfermedad nos ha permitido llegar al concepto de ganglio centinela, abriendo un nuevo horizonte en el diagnóstico de la afectación axilar en el cáncer de mama y permitiendo la instauración de una técnica diagnóstica mínimamente invasiva y con una tasa de complicaciones mucho menor que la linfadenectomía axilar reglada (58, 171, 172).

1.6.3 CONCEPTO Y DESARROLLO HISTORICO DE LA BIOPSIA SELECTIVA DEL GANGLIO CENTINELA

El concepto de **ganglio centinela** en el cáncer de mama se fundamenta en un modelo mecanicista (173). El argumento central se basa en que las células tumorales se diseminan ordenadamente a través del sistema linfático y, de esta forma, la afectación de los ganglios linfáticos no es un acontecimiento aleatorio sino que, por el contrario, se rige por un orden mecánico determinado por el flujo linfático entre el tumor y su primera estación ganglionar (Figura 6).

Se define al **ganglio centinela** como el primer ganglio de una cadena linfática que recibe el flujo linfático desde el tumor primario y, por lo tanto, el primero en acoger las células tumorales diseminadas por el sistema linfático.

El valor clínico de la biopsia selectiva del GC (BSGC) reside en su valor predictivo sobre el estado ganglionar axilar ya que, en el modelo actual de la enfermedad, se acepta que si el mismo no contiene células tumorales tampoco el resto de ganglios axilares presentarán enfermedad metastásica y, por tanto, podría evitarse la linfadenectomía axilar reglada como método de estadificación.

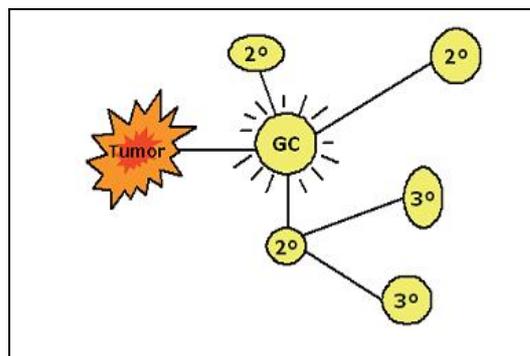


Figura 6.- Esquema representativo del concepto de ganglio centinela.

La BSGC fue descrita por Cabañas en 1977, en relación a la diseminación inguinal en el cáncer de pene (174). El fue el pionero en proponer que el primer ganglio que recibía el drenaje linfático a partir del tumor primario podía ser reseado con una cirugía limitada y que

su estado determinaba la realización de una linfadenectomía más extensa. Sin embargo, Cabañas se basó en estudios linforradiológicos y en su propia experiencia quirúrgica, y no llegó a utilizar técnicas específicas de localización intraoperatoria, lo que probablemente contribuyó a la escasa difusión de la técnica.

En 1992 Morton (175) aplicó la misma idea a la diseminación linfática del melanoma cutáneo, introduciendo ya un método para su localización intraoperatoria basado en colorantes vitales (Lymphazurin®). Este trabajo inicial de Morton se considera el catalizador que ha promovido todo el desarrollo posterior de la biopsia del ganglio centinela. Posteriormente Van der Veen (176) utilizó la linfoescintigrafía intraoperatoria como técnica para identificar los ganglios linfáticos en el melanoma. Estos autores demostraron que las metástasis iniciales del melanoma ocurren en el ganglio centinela y notificaron menos del 1% de falsos negativos en 500 pacientes.

La técnica de la BSGC en el cáncer de mama empezó a llevarse a cabo por Krag y su equipo en 1993 (177), utilizando trazadores isotópicos coloideos y una sonda detectora gamma quirúrgica para facilitar la localización y biopsia del ganglio centinela en el cáncer de mama.

En 1994 el grupo de Giuliano (178), utilizó la inyección peritumoral intraoperatoria de colorantes vitales para la localización del GC. Desde entonces ha habido un rápido incremento en la extensión de la técnica de la biopsia del ganglio centinela con el objetivo de disminuir la morbilidad de la disección axilar rutinaria en pacientes con estadios tempranos del cáncer de mama.

Actualmente se considera que, aunque la utilización única de radiotrazador es suficiente para la localización del ganglio centinela axilar, la técnica combinada de radiotrazador más colorante puede mejorar la detección del ganglio centinela y el aprendizaje de dicha técnica. Además, la gammagrafía preoperatoria mejora los resultados de la detección del ganglio centinela (179).

1.6.4 INDICACIONES Y CONTRAINDICACIONES DE LA BIOPSIA DEL GANGLIO CENTINELA

Para la realización de la biopsia del ganglio centinela, se debe realizar una selección rigurosa de las pacientes. También es importante el nivel de entrenamiento del cirujano en este tipo de técnicas (172, 173, 180, 181).

La biopsia selectiva del GC en el cáncer de mama debe considerarse en pacientes con biopsia concluyente para carcinoma de mama o, en su defecto, punción con citología

compatible, a las que se ha planteado cirugía de la mama y linfadenectomía axilar y que no presentan ganglios linfáticos clínica o ecográficamente sospechosos de infiltración metastásica.

El último documento de consenso realizado por la Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria (SESPM) en Valencia recoge, a modo de guía, las indicaciones y contraindicaciones de la técnica (179).

1.6.5 MARCADORES UTILIZADOS PARA LA LOCALIZACIÓN DEL GANGLIO CENTINELA: COLORANTES VITALES Y TRAZADORES ISOTÓPICOS

1.6.5.1 *Colorantes vitales*

Se precisa de algún sistema fiable para la detección del GC *in vivo* para distinguirlo del resto de ganglios regionales y realizar su biopsia selectiva. La base de este sistema es la utilización de trazadores específicos que son inyectados en la vecindad del tumor y que marcarán el drenaje linfático característico de cada paciente (Figura 7). Inicialmente, tal como fue descrita en los trabajos pioneros de Morton en pacientes con melanoma (175), la biopsia selectiva del ganglio centinela se llevó a cabo mediante el uso del colorante quirúrgico Lymphazurin® (Azul de Isosulfán, Isosulfan Blue Vital Dye). Otro compuesto, el Azul Vital (Patent Blue-V Dye) también ha sido descrito para la biopsia del ganglio centinela.

La experiencia hasta ahora acumulada demuestra que la eficacia técnica en la biopsia del ganglio centinela no alcanza niveles óptimos si sólo se usan colorantes, especialmente si se compara con la utilización combinada o no de trazadores isotópicos (182-186).

En el momento actual, la Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria desaconseja el uso exclusivo del colorante como técnica de localización del ganglio centinela aconsejando, en cambio, la técnica mixta (radiotrazador más colorante), sobre todo en período de aprendizaje y en aquellos casos con dificultades de visualización en la linfogammagrafía preoperatoria (179).

1.6.5.2 *Trazadores isotópicos*

La utilización de un radioisótopo permite, en la mayoría de las enfermas, la identificación del GC a las 2-3 horas de su inyección en una gammagrafía de control (Figura 7). En España, los radiotrazadores utilizados con mayor frecuencia son el nanocoloide de albúmina, el coloide de estaño y el sulfuro de renio. Hay un acuerdo general por el que el tamaño de las partículas varía entre 50 y 200 nm para una óptima localización del GC, habiendo un compromiso entre la rapidez del drenaje linfático y una retención adecuada del

radiotrazador en el GC. Las dosis varían entre 18,5-111 MBq (0,5-3 mCi) en función del tiempo transcurrido hasta la intervención quirúrgica. El volumen administrado varía entre 0,2 y 3 ml según los centros.

Según el documento de consenso de la Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria (179) la vía de inyección del radiotrazador será, preferiblemente, intra o peritumoral, aunque algunos autores afirman que las inyecciones periareolares y/o subdérmicas son también una opción correcta (187-189). Se recomienda un ligero masaje sobre la zona de la administración posteriormente a la inyección del radiotrazador, especialmente en el caso de pacientes con edades avanzadas y obesas.

La principal ventaja del marcaje isotópico es que permite al cirujano determinar con exactitud la localización del GC *antes de iniciar el acto quirúrgico*, ya que a través de la piel puede identificar la posición exacta del ganglio centinela antes de la incisión, permitiendo una disección mínima en la axila (Tabla 8). Dado que en más del 90% de las ocasiones están siempre en la misma zona axilar, en el Hospital Universitario de Salamanca siempre se realiza la incisión en la raíz del vello axilar que, además, es la más estética. La realización de una gammagrafía tras la inoculación del isótopo permite identificar ganglios centinelas en localizaciones extra-axilares. Estas características hacen que la técnica isotópica sea en la actualidad el método principal para el marcaje del ganglio centinela y de obligada realización para cualquier grupo que desee validar la biopsia selectiva del ganglio centinela (179).

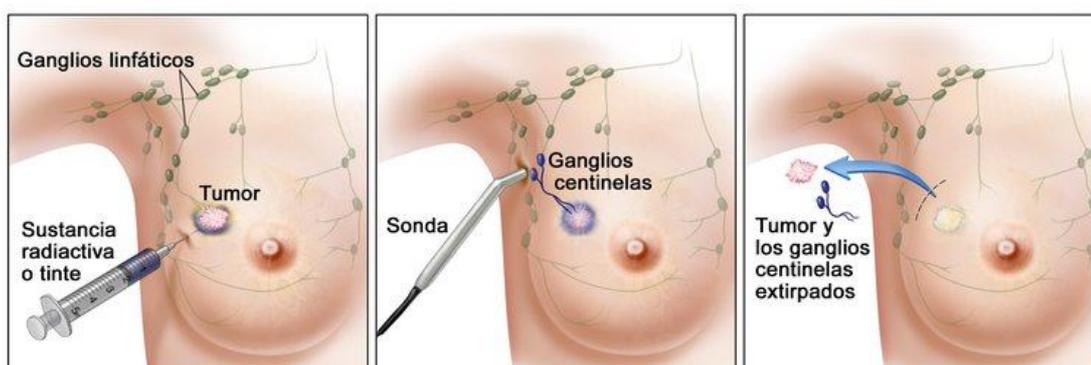


Figura 7.- Esquema representativo de la localización intraoperatoria del ganglio centinela mediante colorantes vitales y trazadores isotópicos. Imagen tomada de <http://www.cancer.gov>.

Las desventajas del método isotópico se relacionan con su mayor complejidad organizativa, al precisar de un servicio de medicina nuclear que efectúe el marcaje y de una sonda de detección gammagráfica para la identificación intraoperatoria del ganglio centinela. En el contexto de la práctica clínica, existe una limitación en las lesiones localizadas en el cuadrante superoexterno y cola de Spencer al superponerse la emisión de la dosis inoculada con la del propio GC, el denominado fenómeno “*shire through*” (190) (Tabla 8).

Tabla 8.- Valoración de las técnicas de marcaje en la BSGC. (Modificado de: Acea Nebriil B, 2003).

Técnica	Ventajas	Desventajas
Marcaje con colorante.	<ul style="list-style-type: none"> • Técnica segura. • Sólo requiere destreza quirúrgica. • Buena relación Coste/Efectividad. • Localización visual intraoperatoria. • Localización rápida. 	<ul style="list-style-type: none"> • La identificación depende del cirujano. • No existe identificación preoperatoria. • Requiere una importante curva de aprendizaje. • Incrementa el tiempo de intervención. • GC desapercibidos. • Reacciones alérgicas al colorante. • Tatuaje. • No se detectan los GC en mamaria interna. • No se detectan los GC intramamarios.
Marcaje con isótopo.	<ul style="list-style-type: none"> • Procedimiento multidisciplinario. • Existe una identificación preoperatoria. • Detección con medición cuantitativa. • Detecta GC en mamaria interna. 	<ul style="list-style-type: none"> • Procedimiento multidisciplinario. • Exige el preparado del radiocoloide. • Requiere instrumentación especial. • No identifica GC cercanos a la inoculación del isótopo. • Incrementa el tiempo de intervención. • Difícil reconocimiento de los ganglios intramamarios.
Combinación de colorante e isótopo.	<ul style="list-style-type: none"> • Facilita la curva de aprendizaje. • Existe una identificación preoperatoria. • Identificación del GC por disección y sonda. • Detección con medición cuantitativa. • Incrementa la eficacia técnica. • Detecta GC en mamaria interna. 	<ul style="list-style-type: none"> • Exige el preparado del radiocoloide. • Requiere instrumentación especial. • No detecta GC intramamarios. • Reacciones alérgicas. • Tatuaje. • Procedimiento multidisciplinario.

1.6.6 ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO DEL GANGLIO CENTINELA

La introducción de la técnica de la biopsia selectiva del ganglio centinela (en referencia a la técnica de la búsqueda, extracción y análisis del mismo para la detección de infiltración tumoral) en la estadificación del cáncer de mama ha permitido concentrar los esfuerzos diagnósticos del anatomopatólogo en tan sólo uno o dos ganglios, en vez de tener que hacerlo en diez o más cuando se trataba de una linfadenectomía axilar clásica. Esto favorece la aplicación de nuevas técnicas diagnósticas anatomopatológicas más exactas que permitan limitar el número de falsos negativos, el principal temor cuando se aplica esta técnica.

Ya en los primeros estudios del grupo de Giuliano se observaron casos falsamente negativos mediante la aplicación del análisis histológico convencional, que tras su revisión fueron reconvertidos a verdaderos positivos al aplicar técnicas más depuradas del análisis del ganglio centinela (178). A medida que hemos ido avanzando en el desarrollo de la biopsia selectiva del ganglio centinela en el cáncer de mama se ha asumido que debemos introducir técnicas histopatológicas especiales, optimizadas, que permitan no sólo catalogar correctamente como positivos o negativos a los ganglios centinelas, sino incluso mejorar la estadificación de las pacientes gracias a la detección de micrometástasis (microestadificación) (191). Se estima que las metástasis linfáticas del cáncer de mama se concentran en una franja ecuatorial, paralela al eje mayor del ganglio y, por tanto, los cortes con mayor rendimiento serían los centrales (192).

El estudio anatomopatológico del ganglio centinela tiene lugar en dos fases. Inicialmente se lleva a cabo un estudio histológico intraoperatorio, que permite al cirujano decidir si debe practicar o no linfadenectomía axilar completa en función del resultado del ganglio centinela, sin tener que reintervenir a la paciente posteriormente. Este estudio se realiza mediante cortes por congelación y tinción con hematoxilina-eosina, realizando secciones a distintos niveles que permitan la detección de, al menos, metástasis de más de 2 mm. Si no se objetiva tumor intraoperatoriamente se debe completar el estudio en diferido mediante inclusión en parafina y secciones del tejido restante al menos cada 200 micras, haciendo marcadores inmunohistoquímicos (citoqueratinas) para detectar carcinoma oculto o micrometástasis si la técnica de hematoxilina-eosina es negativa. Este es un estudio más minucioso del ganglio centinela, y en ocasiones el resultado difiere del obtenido de forma preoperatoria, por lo que la paciente debe ser reintervenida si se modifica la estadificación axilar (192, 193).

1.6.7 ESTUDIO MOLECULAR DEL GANGLIO CENTINELA: EL METODO OSNA

En la actualidad éste es el método de estudio recomendado por la Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria en el Documento de Consenso de 2010 (179) para realizar el examen intraoperatorio del ganglio centinela.

El método OSNA (One Step Nucleid Acid Amplification, amplificación de ácidos nucleicos en un solo paso) constituye un nuevo enfoque diagnóstico que, por primera vez, permite analizar la totalidad del ganglio linfático de manera intraoperatoria. De esta forma es posible tomar una decisión clínica definitiva sin necesidad de realizar un segundo procedimiento quirúrgico o un análisis histopatológico confirmatorio.

Este método realiza en un solo tiempo el análisis completo del GC mediante la cuantificación de la expresión de ARNm de CK 19 por un método de amplificación isotérmica que consigue tiempos de amplificación de 16 minutos. El escaso tiempo requerido para el procedimiento, que oscila alrededor de 30-40 minutos, permite realizar un diagnóstico intraoperatorio de hasta 4 ganglios en paralelo, evitando la morbilidad y los costes de una segunda intervención. Por otra parte, el OSNA permite el estudio del ganglio linfático en su totalidad, evitando el "desperdicio" de tejido inherente incluso al procedimiento histológico más exhaustivo (194-196).

La gran ventaja de este procedimiento consiste en lograr la estandarización de resultados a fin de poder comparar grupos pronósticos realmente semejantes, que no dependan del procedimiento de estudio ni del patólogo que lo interprete. El sistema OSNA es una técnica de alta sensibilidad, especificidad y reproducibilidad diagnósticas en un tiempo limitado, evitando reintervenciones innecesarias (197).

Se recomienda un número máximo de tres ganglios centinela aunque es aceptable hasta cuatro. Se utiliza el ganglio en su totalidad, aunque puede realizarse una citología por impronta antes de homogeneizar el ganglio para el estudio molecular, tratando de evitar cualquier causa de contaminación.

Previamente debe realizarse en el tumor (BAG previa) el estudio inmunohistoquímico de expresión de Citoqueratina 19. Los casos en que el tumor no exprese CK19 no deberían estudiarse por este método (198, 199).

Se define como ganglio positivo o afectado aquel que presenta células tumorales metastásicas, debiendo ser clasificadas de la siguiente forma según este método de estudio (179):

- **Macrometástasis** (pN1, sistema TNM de estadificación): N° de copias de mARN-CK19 \geq 5000 copias.

- **Micrometástasis** (pN1mic, sistema TNM de estadificación): N° de copias de mARN-CK19 $\geq 250 < 5000$ copias
- **CTA** (pN0 mol+, sistema TNM de estadificación): N° de copias de mARN-CK19 < 250 copias

1.6.8 ¿ES NECESARIA SIEMPRE LA LINFADENECTOMÍA AXILAR DE RESCATE SI EL GANGLIO CENTINELA ESTÁ AFECTADO?

Como se ha comentado, la técnica de la biopsia selectiva del ganglio centinela ha demostrado ser capaz de sustituir a la linfadenectomía axilar clásica cuando se realiza por equipos expertos en los que dicha técnica está validada, tanto en el estadiaje axilar del cáncer de mama como en el control locorregional de la enfermedad. Por otra parte, el hecho de obtener un mínimo número de ganglios para estudio ha posibilitado la introducción de nuevas técnicas diagnósticas anatomopatológicas que aumenten la sensibilidad para la detección de micrometástasis. Siguiendo el concepto de ganglio centinela, si éste no está afectado, no debe realizarse linfadenectomía axilar, pero ¿qué ocurre si se demuestra infiltración macro o micrometastásica? ¿Debe hacerse linfadenectomía axilar rutinaria en todos los casos?

Existen estudios que demuestran que, en presencia de micrometástasis axilares ganglionares, los ganglios no centinelas del resto de la cadena presentan una afectación que varía entre el 32 y el 68%, con una afectación media del 55% (200), por lo que entre un 68 y un 32% de dichas pacientes, respectivamente, no se beneficiarían de dicha linfadenectomía axilar, sino que estarían sobretratadas y sometidas a los efectos secundarios de una intervención innecesaria. Solá et al. (201) realizaron un estudio randomizado con 247 pacientes con carcinoma de mama en estadios iniciales (T1-2, N0, M0) y micrometástasis en el ganglio centinela en el que se comparaba la realización de linfadenectomía axilar (LA) frente a no ampliar la cirugía axilar en términos de pronóstico a largo plazo, utilizando como objetivo principal la valoración de la supervivencia libre de enfermedad a 5 años. Estos autores no encontraron diferencias en términos de supervivencia libre de enfermedad ni supervivencia global entre los dos grupos del estudio al cabo de cinco años, por lo que concluyen que en pacientes con carcinoma de mama en estadios iniciales y micrometástasis en el ganglio centinela, la biopsia selectiva del ganglio centinela es suficiente tanto para el control locorregional de la enfermedad como de la enfermedad a distancia, y no presenta diferencias significativas en términos de supervivencia respecto a la LA clásica. El estudio ACOSOG Z0011 (202), un estudio prospectivo con más de seis años de seguimiento en el que se incluyeron 813 pacientes con tumores T1-2, N0 y GC positivo, demostró que la observación (sin LA) en mujeres con afectación macro o micrometastásica del GC presenta tasas similares en el

control regional cuando se ha comparado con pacientes sometidas a LA. A todas las pacientes del estudio se les administró radioterapia local y quimioterapia sistémica. Por otro lado, un grupo significativo de estas mujeres no presentarán otros ganglios afectados durante el estudio de la grasa axilar y por ello no se beneficiarán de este procedimiento para optimizar la planificación de su tratamiento adyuvante. Otros estudios (203, 204) también avalan los resultados del ACOSOG Z0011.

Estos hallazgos nos obligan a una nueva consideración sobre la indicación de la LA en pacientes con afectación metastásica del GC. La Asociación Española de Cirugía Mamaria (AECIMA) considera que en la actualidad es posible la supresión de la LA en un grupo seleccionado de mujeres con afectación metastásica del GC y que se fundamenta en la evidencia científica actual y en las recomendaciones de las guías clínicas internacionales. Esta decisión debe ser individualizada en cada caso y debe ser tomada en el contexto de la valoración multidisciplinar.

Durante el Primer Congreso Nacional de AECIMA se discutió una propuesta para la selección de mujeres con afectación metastásica del GC en las que se puede plantear la supresión de la LA. Los criterios básicos acordados fueron los siguientes:

Criterios de Inclusión: (se exige el cumplimiento de todos los criterios)

- Tumores menores de 2 cm de diámetro (T1)
- Afectación de 1-2 ganglios centinelas (micro o macrometástasis)
- Cirugía conservadora

Criterios de Exclusión: (cualquiera de estas situaciones es indicación de LA)

- Afectación metastásica de 3 o más ganglios centinelas
- Invasión extracapsular del ganglio centinela
- Pacientes mastectomizadas
- Imposibilidad para la radioterapia postoperatoria en mama
- Tumores con subtipo triple negativo
- Tumores subtipo HER2 sin tratamiento biológico complementario

1.7 EL PAPEL DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO EN LA DETECCIÓN DE ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL GANGLIONAR EN EL CÁNCER DE MAMA

En los últimos años ha aumentado la evidencia sobre la escasa sensibilidad de los métodos histopatológicos convencionales para detectar pequeños infiltrados ganglionares por células tumorales, lo que podría justificar la relativamente elevada incidencia de recidivas en pacientes sin aparente afectación ganglionar al diagnóstico. Por todo ello, se ha reconocido la necesidad de emplear técnicas más sensibles para la detección de infiltración ganglionar en el cáncer de mama. La introducción de técnicas inmunohistoquímicas y el análisis de cortes seriados con el fin de investigar la presencia de células tumorales en ganglios axilares, ha demostrado que alrededor del 10% de las pacientes en las que la afectación axilar fue considerada negativa con técnicas convencionales mostraban infiltración ganglionar metastásica cuando se empleaban estas técnicas más sensibles (205-207).

Pese a incrementar la sensibilidad diagnóstica de la infiltración ganglionar, seguía existiendo una proporción relativamente alta de recidivas en pacientes consideradas como sin afectación axilar (ganglios negativos) incluso con esta técnica, indicando la necesidad de, o bien emplear técnicas aún más sensibles que la inmunohistoquímica a nivel ganglionar o investigar sobre la posible existencia de otros focos o vías de diseminación tumoral que explicaran la recidiva tumoral de pacientes ganglio-negativas.

1.7.1 INMUNOFENOTIPAJE POR CITOMETRÍA DE FLUJO

El empleo combinado de técnicas de inmunofenotipaje y citometría de flujo ha demostrado ser una de las alternativas más atractivas con una inmensidad de aplicaciones en el cáncer que pueden enmarcarse en dos bloques bien diferenciados. Uno es el conocimiento y reconocimiento del fenotipo de las células neoplásicas de cada patología, así como de su contrapartida normal, lo que ha permitido grandes avances en los últimos años tanto para el diagnóstico diferencial de las diferentes patologías como para la evaluación de la respuesta al tratamiento (208). El otro bloque lo constituyen los estudios de detección de enfermedad mínima residual, que también han permitido el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para aquellos pacientes con pobre respuesta al tratamiento o para aquellos en los que, aunque por técnicas morfológicas estuvieran supuestamente en remisión, la citometría detectó infiltración tumoral a niveles indetectables por la morfología y que recibieron el nombre de enfermedad mínima residual (209, 210). Entre otras ventajas, este método es relativamente rápido y sencillo, permite un análisis multiparamétrico de elevada especificidad

y proporciona resultados cuantitativos. Además, la posibilidad de analizar millones de células incrementa de manera muy sustancial la sensibilidad.

La Citometría de Flujo está plenamente instaurada en los servicios de Hematología e Inmunología con fines diagnósticos y pronósticos desde hace años, y hoy día es inconcebible el diagnóstico y seguimiento de leucemias y linfomas sin esta técnica. Sin embargo, se ha aplicado relativamente poco al estudio de tumores sólidos a pesar de que desde el punto de vista teórico aparece como potencialmente muy útil (211-213). La mayoría de las aplicaciones están relacionadas con la detección de células tumorales circulantes (214-217). Está pendiente, por tanto, que la citometría siga un camino similar en el terreno de la oncología al que ha seguido en el campo de la hematología.

Como el fenotipo de las células tumorales de tumores sólidos prácticamente no se conoce, la citometría de flujo se ha aplicado casi exclusivamente con fines de investigación. Desde el punto de vista técnico, la aplicación más usada en tumores sólidos ha sido la cuantificación del ADN de las células tumorales, como método de identificación y recuento de la fracción de células tumorales en fase de síntesis (fase S) o en fase G2/mitosis (G2M) (218).

A pesar de que el valor de la cuantificación de la fase de síntesis del ciclo celular y el índice de ADN por citometría de flujo ha ofrecido resultados esperanzadores a la hora de predecir el pronóstico de la enfermedad, los resultados han sido muy desiguales, especialmente por las grandes diferencias tanto en las técnicas y equipos utilizados como en los tejidos tumorales sobre los que se ha hecho la valoración de la ploidía del tumor y de la proliferación celular, así como los métodos de cálculo y los puntos de corte usados para el establecimiento de grupos pronóstico. El hecho de que la mayoría de los estudios hayan sido retrospectivos y, por tanto, realizados sobre muestras incluidas en parafina, ha hecho que tanto la incidencia de aneuploidía como la fase de síntesis del tumor, hayan carecido de un rigor exigible a cualquier técnica en términos de estandarización. Ante la disparidad de resultados publicados, en el año 1993, un comité de expertos se reunió con el cometido de dar unos pasos imprescindibles en la estandarización de dicha técnica tanto en tumores hematológicos (219, 220), como no hematológicos (219) y, más concretamente sobre carcinoma de mama (131-133).

El uso del inmunofenotipaje por citometría de flujo para el estudio fenotípico de la célula tumoral está en el principio de su desarrollo, pero se está usando ya para la detección de células tumorales circulantes en varios tipos de tumor, especialmente en cáncer de mama. Gross demostró ya en el año 1995 (221), que la técnica de inmunofenotipaje por citometría de flujo también podía aplicarse, y con elevada sensibilidad (entre 10^5 y 10^6 , alcanzando algunos estudios experimentales 10^7) para detectar células de cáncer de mama en muestra de sangre periférica. La combinación de fenotipo y cuantificación de ADN han mostrado igualmente su

aplicabilidad teórica a la detección de células de cáncer de mama en sangre periférica, con idéntica e incluso superior sensibilidad (222). También se ha descrito el empleo de procedimientos de enriquecimiento magnético podría incrementar esta sensibilidad hasta la detección de una célula tumoral en 1mL de sangre periférica (223).

1.7.2 FUNDAMENTOS DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO

En 1934, Moldavan (224) diseñó el primer instrumento que permitía contar de forma rápida gran cantidad de células, y que ideó con el fin de contabilizar los glóbulos rojos de la sangre. Una de los principales avances de aquel aparato fue introducir un novedoso sistema de análisis de células a su paso por delante de una fuente de luz, basándose en la teoría del flujo laminar producido mediante inyección lenta de la suspensión celular dentro de un fluido más rápido; con ello se consigue ordenar las células de la muestra en un flujo laminar en las que éstas pasan alineadas y de una en una por delante de la fuente de luz.

Posteriormente se introdujeron la absorción y la dispersión de luz como parámetros que se podían medir por citometría de flujo, y se comenzaron a usar también marcadores fluorescentes, consiguiendo así obtener información de varias características de las células interceptadas por el láser. En 1965, Fulwyler (224) describió un instrumento que permitía además clasificar y separar físicamente las células en función de alguna característica (citómetros separadores), lo que aumentó la sofisticación de estos aparatos. A comienzos de los años 80, los citómetros de flujo se simplificaron y su coste se abarató lo que permitió su incorporación a los laboratorios de diagnóstico clínicos; a partir de entonces los avances en citometría de flujo se han centrado en el desarrollo de nuevas aplicaciones clínicas y biológicas.

La evolución tan rápida y difusión de la citometría de flujo ocurrida en los últimos años ha sido posible gracias a que es una tecnología híbrida que combina los avances producidos en campos tan diversos como la informática, la producción de anticuerpos monoclonales, la química de los fluorocromos y las tinciones histoquímicas, así como la tecnología de láser (225).

Desde el punto de vista práctico, el fundamento de la citometría de flujo consiste en hacer pasar partículas (células o elementos subcelulares como núcleos, mitocondrias, etc.), generalmente marcadas con sustancias fluorescentes, por delante de una fuente de luz. La interacción de las partículas con el rayo luminoso provoca una serie de señales (debidas a la dispersión de la luz, y a la emisión de luz por los marcadores fluorescentes) que son recogidas por detectores y transformadas en pulsos eléctricos. Posteriormente, estos pulsos se

amplifican y se convierten en señales digitales que son procesadas por un ordenador (Figura 8).

Este sistema nos permite medir al mismo tiempo varias características de cada célula (análisis multiparamétrico). Así, cuando el láser interacciona con la célula, la luz que se dispersa hacia delante (recogida por el detector FSC, forward scatter) da una idea del tamaño celular, y la luz que se dispersa en ángulo recto (recogida por el detector SSC, side scatter) es un reflejo de la complejidad interna de la célula. Además, en los citómetros de flujo más utilizados actualmente se pueden detectar cada vez más moléculas fluorescentes diferentes presentes en una misma célula, utilizando otros tantos fluorocromos con la única limitación de que cada fluorocromo pueda separarse de otro porque se lea en un detector diferente, es decir que emitan fluorescencia en longitudes de onda diferentes. Las diferencias entre unos citómetros de flujo y otros hasta ahora estriba más en los nombres que se le dan a los detectores que al esquema general de funcionamiento. El desarrollo reciente de los citómetros de flujo se ha encaminado principalmente a incrementar el número de parámetros que es posible leer en una sola determinación.

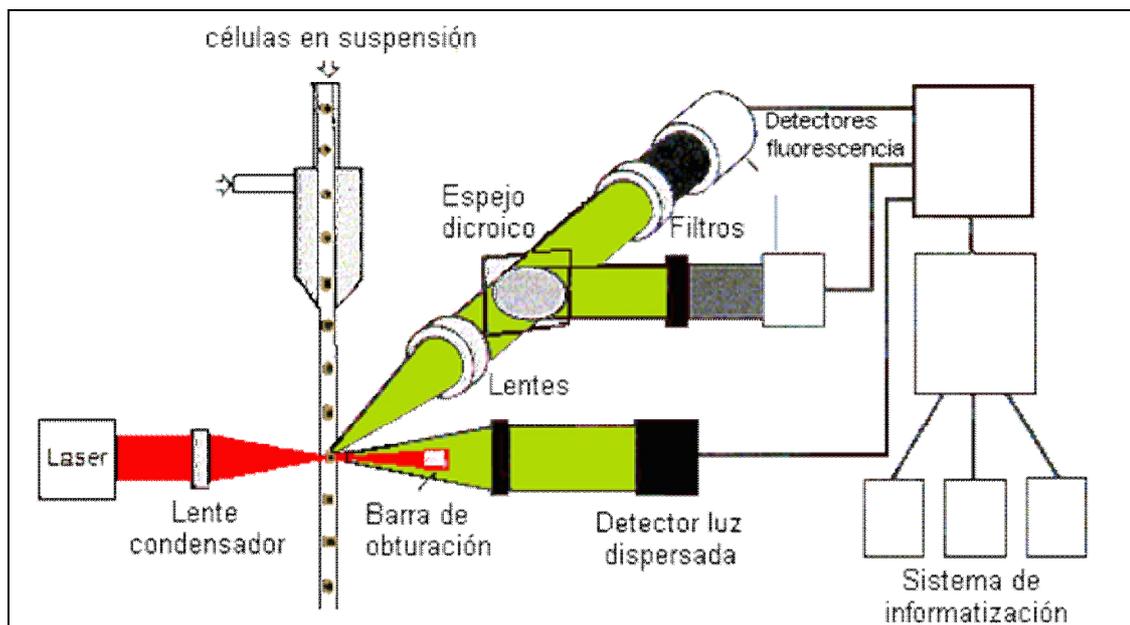


Figura 8.- Representación gráfica esquemática del funcionamiento de un citómetro de flujo.

Por tanto, los componentes fundamentales de un citómetro de flujo incluyen:

1. Una o varias fuentes de luz (generalmente se utilizan láseres), cuya longitud de onda es capaz de excitar a los fluorocromos empleados para marcar las células

2. Un sistema de fluidos, que permite que las células pasen de forma alineada delante del láser y de una en una.
3. Un sistema óptico, que recoge las señales producidas por cada célula, y separa fotones con distinta longitud de onda dirigiéndolas a diferentes detectores.
4. Un sistema electrónico que permite la transformación de luz en corriente eléctrica y su posterior señal digital.
5. Y, por último, un sistema informático con programas adecuados tanto para la recopilación de la información como para el manejo de los datos generados. Esto nos permite, además de visualizar directamente las poblaciones celulares, obtener información numérica objetiva en forma de porcentajes, valores medios y medidas de dispersión (como la desviación estándar y el coeficiente de variación).

La cuantificación de ADN celular representa, desde el punto de vista cronológico, la primera aplicación de la citometría de flujo y se basa en el empleo de fluorocromos específicos de ADN. Existen diferentes fluorocromos capaces de unirse al ADN celular, de ellos el yoduro de propidio (IP) es el más utilizado en la actualidad. El IP se excita a una longitud de onda de 488 nm y se une de forma estequiométrica a la doble cadena de ADN. Como también se une al ARN de doble cadena, hay que tratar a las células previamente con una ARNasa.

Hasta ahora las aplicaciones clínicas de uso más extendido son aquellas basadas en el análisis inmunofenotípico de células empleando diferentes combinaciones de anticuerpos monoclonales. Es en ese campo donde la citometría está adquiriendo un desarrollo espectacular (129, 208).

1.7.3 MARCADORES ESPECIFICOS DE CELULAS TUMORALES: CITOKERATINAS

Las **citoqueratinas (CK)** son proteínas que forman parte del citoesqueleto tanto de tejidos epiteliales normales como neoplásicos, siendo empleadas de forma rutinaria para identificar células de origen epitelial, como las de cáncer de mama, en lugares distintos a su localización habitual (226). Los anticuerpos monoclonales dirigidos frente a CK han sido y son el marcador de células aisladas y micrometástasis más utilizado en los estudios realizados con el fin de investigar la presencia de células tumorales de cáncer de mama aisladas o en forma de micrometástasis, especialmente en medula ósea (227, 228), existiendo incluso estudios que indican que la utilización de algunos clones sería específica (213). Pese a ello, en la actualidad existe cierta controversia sobre cuál de las CK propias de las células epiteliales sería la más adecuada, con relación a su especificidad, para ser empleada de forma rutinaria para la

detección de pequeñas cantidades de células tumorales en muestras de médula, sangre periférica, o ganglios de pacientes con cáncer de mama.

Las células derivadas del epitelio adquieren estas estructuras llamadas CK pero cada tejido tiene su propio patrón de expresión de CK (229). En carcinoma de mama, las CKs más frecuentemente expresadas son la CK8, CK18, la CK19 y la CK20 (229).

Hay estudios publicados que apuntan a que la CK19 sería la más específica de célula tumoral de carcinoma de mama si usamos técnicas de PCR (230, 231) aunque se ha demostrado que se expresa también en células sanas (232) por lo que otras investigaciones apuntan que la combinación de AcMc anti-ck20 y anti-βHCG sería el más adecuado (233).

Los anticuerpos explorados por citometría de flujo que han ofrecido mejores resultados a la hora de detectar células tumorales de carcinoma de mama han sido los que se unen específicamente a la CK18, mostrando mayor relación sensibilidad/especificidad (222).

1.7.4 ESTUDIO DEL CICLO CELULAR MEDIANTE CMFm

Los diferentes estudios llevados a cabo sobre el ciclo celular han permitido definir la existencia de dos períodos interdependientes: el de división celular, en el que se replica y segrega el genoma, y el de crecimiento celular o interfase, en el que se duplican las proteínas y los orgánulos de la célula (129). Desde un punto de vista práctico, y a efectos del estudio que se realiza por citometría de flujo, dentro del ciclo celular se diferencian tres fases, denominadas Reposo (G0/G1), Síntesis (S), y G2 + Mitosis (G2/M) (Figura 9).



Figura 9.- Representación esquemática del ciclo celular.

La replicación del ADN y la síntesis de las histonas para formar los cromosomas se producen durante la fase S, y la segregación de los cromosomas tiene lugar durante la fase M o mitosis. En la mayoría de los ciclos celulares hay etapas quiescentes entre estos dos hechos: una denominada G1 tras la mitosis y antes de la fase S y otra G2 tras la fase S y antes de la mitosis. Actualmente se sabe que ambas fases (G1 y G2) son períodos de vital importancia para que la célula pueda llevar a cabo su división. Durante la fase G1 tiene lugar la síntesis de proteínas que permitirá a su vez la síntesis de ADN. De igual manera, durante la fase G2 se lleva a cabo una síntesis tardía de proteínas que asegura el éxito del proceso de división no sólo del material genómico, sino de toda la célula (129).

La división celular está acoplada al crecimiento celular en un punto de la fase G1 conocido como punto de restricción o comienzo. Cuando las células no están experimentando activamente la reproducción, salen del ciclo celular y entran en un estado quiescente. Esta salida normalmente se produce durante G1, y el estado quiescente se denomina G0.

La mitosis es la división celular mediante la cual la célula madre da lugar a dos hijas idénticas. La mitosis se divide en cuatro fases: profase, metafase, anafase y telofase. La interfase es el período entre las divisiones celulares e incluye las fases G1, S y G2 del ciclo celular.

La citometría de flujo ha representado en los últimos años una herramienta fundamental en los estudios del ciclo celular, tanto de células normales como patológicas por su simplificación respecto a otras técnicas y porque no usa métodos radioactivos, los más utilizados hasta su desarrollo. Esta técnica permite obtener información sobre la distribución de una población celular determinada a lo largo de las distintas fases del ciclo, la determinación de la duración de cada una de las fases del ciclo y el número de ciclos realizados por una célula o grupo de células durante un determinado período de tiempo, así como el análisis de la expresión de proteínas relacionadas con la proliferación celular. Y todo esto mediante un proceso técnico rápido y sencillo (129, 224).

En referencia al valor que en la práctica clínica tiene la medición de la proliferación celular, la existencia de una tasa proliferativa elevada en los tumores sólidos se asocia globalmente con un diagnóstico histopatológico de malignidad, con características clínicas, biológicas e histológicas de mal pronóstico y, en definitiva, con una peor evolución de la enfermedad y una supervivencia más corta (234-237)

También se ha relacionado la tasa de proliferación celular con la respuesta a determinadas terapias, especialmente aquellas que van dirigidas a células en fase de replicación y/o división celular (238).

1.7.5 CUANTIFICACIÓN DE ACIDOS NUCLEICOS MEDIANTE CMFm

La cuantificación de ácidos nucleicos mediante el empleo de diferentes compuestos químicos fluorescentes capaces de unirse de forma específica al ADN, al ARN o a ambos representa una de las primeras aplicaciones de la citometría de flujo (129).

Bajo el término aneuploidía de ADN se incluyen todas las alteraciones cuantitativas de ADN, en las que las células denominadas aneuploides muestran una cantidad de ADN diferente de la detectada en células normales diploides en la misma fase del ciclo celular. La alteración puede ser por exceso o por defecto, denominándose hiperploidía o hipoploidía de ADN, respectivamente (129).

Para medir la cuantía de la alteración se utiliza el parámetro índice de ADN (IADN). Este índice representa el cociente entre la moda del canal medio de fluorescencia detectada para las células problema en las fases G0/G1 del ciclo celular y la moda del canal medio de la fluorescencia obtenida para las células normales diploides en la misma fase del ciclo celular. Cuando el IADN es igual a 1 asumimos que el tumor es diploide, y cuando es diferente de 1 hablamos de tumor aneuploide. Si el IADN es superior a 1 estaremos ante una hiperploidía de ADN, y cuando éste es inferior a 1 ante una hipoploidía de ADN (129).

El estudio de la ploidía de ADN en tumores sólidos revela que las células tumorales a menudo poseen cantidades anormales de ADN (aneuploidías de ADN) en comparación con las células normales. En función del estatus de ploidía los tumores pueden ser clasificados como tumores con contenido diploide o aneuploide de ADN. El estudio de la ploidía de ADN ha mostrado tener significado pronóstico independiente en diferentes tipos de cáncer (239-242).

1.7.6 ANÁLISIS DE RESULTADOS EN CITOMETRÍA

En la citometría de flujo multiparamétrica, en la cual se analizan a la vez varios parámetros celulares, la forma más habitual de representar los datos obtenidos es mediante un diagrama bidimensional conocido con el nombre de "dot plot". En él se representa con un punto cada partícula analizada, y en cada eje se indica uno de los diferentes parámetros que estamos midiendo para esa partícula. De cada una de las partículas, que en Citometría se llaman "eventos", tendremos información sobre todos los parámetros que puede detectar el citómetro: FSC (reflejo del tamaño celular), SSC (reflejo de la granularidad celular), y tantas moléculas distintas como detectores de fluorescencia permita el citómetro usado. Generalmente, se puede leer un marcador para cada fluorescencia siempre que se hayan corregido electrónicamente los solapamientos entre fluorocromos mediante la denominada "compensación de fluorescencias".

El colorante más usado en laboratorios clínicos para la cuantificación de ADN es el ioduro de Propidio (IP). La estrategia de análisis para calcular la ploidía de ADN y las proporciones de células en las diferentes fases del ciclo celular se basa en que la intensidad de fluorescencia detectada para el IP es proporcional a la cantidad de ADN.

De esta forma, la cantidad de ADN de una población celular patológica se mide en relación a la de otra población celular normal que funciona como control. Así, el canal de fluorescencia de una población tumoral se valorará en relación al canal de fluorescencia de una población normal y el canal de fluorescencia de las células en fase de síntesis en relación a las células en fase de reposo (G0/G1) del ciclo celular. Como población normal nos referimos, entre otras, a los leucocitos que infiltran el tejido tumoral y que están presentes en todos los tejidos neoplásicos en cantidad suficiente para que sirvan de control.

Como dos células en fase G0/G1 que sean interceptadas por el láser darían lugar a la misma intensidad de fluorescencia que una sola célula en fase G2/M o una célula tetraploide, los citómetros tienen una estrategia para distinguir esos llamados dobletes de las células en mitosis o tetraploides. Así, la señal de fluorescencia para FL2 (detector que recoge la fluorescencia del IP) se separa en dos señales:

- FL2-Area (FL2-A, que mide el área del pulso generado por el paso de la célula delante del láser).
- FL2-Wide (FL2-W, que mide la amplitud de ese mismo pulso, que da una idea del tiempo que tarda la partícula medida en pasar por delante del láser).

De esta forma, durante el proceso de análisis, en el diagrama FL2-A frente a FL2-W se eliminan los dobletes, tripletes, etc. (Figura 10).

Así mismo, en el proceso de análisis, aparte de la eliminación de los dobletes se eliminan también los restos celulares (células no viables, restos de membranas, etc.) en virtud de que dichos restos celulares tienen un tamaño muy pequeño y no incorporan el IP o al menos no lo hacen en la proporción que los acercaría a las células G0/G1 o incluso a las células hipodiploides (Figura 10).

Diferentes autores, entre ellos Ramón García Sanz, han demostrado la utilidad de realizar un marcaje celular de forma previa a la adición de IP para cuantificar el ADN de una población concreta, en su caso las células plasmáticas, positivas para CD38 y CD138 (243) (Figura 11). Esta estrategia es útil en los tumores primarios, al permitir, por un lado, la detección de clones tumorales con diferente ploidía y, por otro, el cálculo del ciclo celular de las poblaciones tumorales, sin interferencia de otras células, pero es especialmente

interesante en los estudios de identificación de células tumorales en ganglios centinela por aumentar muy significativamente la sensibilidad de la técnica.

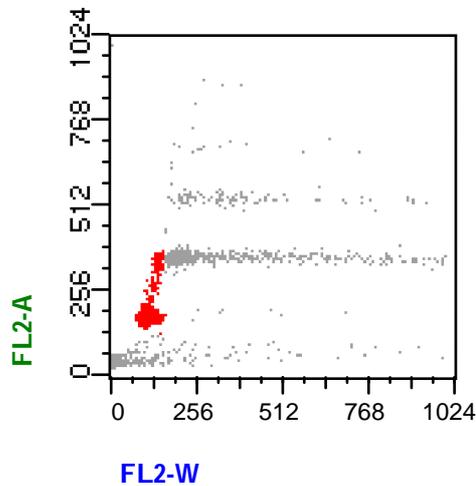


Figura 10.- Ejemplo representativo de la estrategia de análisis donde se muestran en rojo las células individuales íntegras (eliminados los dobletes y los restos celulares del análisis) que constituyen la población de interés en un diagrama FL2A/FL2-W.

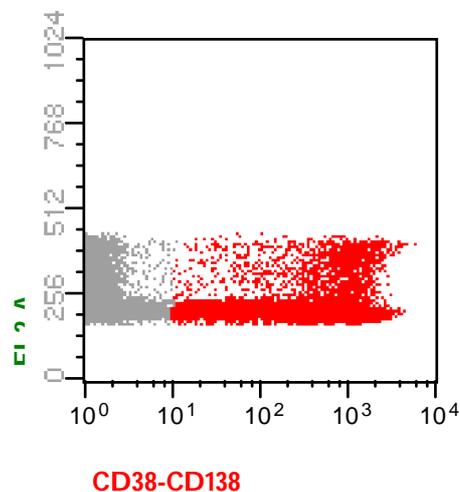


Figura 11.- Ejemplo representativo de cuantificación de ADN sobre una muestra de médula ósea marcada con un anticuerpo específico de células plasmáticas (CD38-CD138).

En este sentido, también hay estudios que han demostrado la utilidad de este doble marcaje (celular con un anticuerpo y nuclear con el IP para el estudios del ADN en tumores sólidos, en concreto de vejiga (244) y de mama (222) mediante el marcaje celular con anticuerpos anticitoqueratinas previa a la adicción de IP.

La utilización del marcaje con CK18 simultáneamente con la cuantificación de ADN permite detectar poblaciones celulares que podrían pasar desapercibidas con la cuantificación de ADN de tumor total, además de permitir un cálculo mucho más exacto de la proliferación celular o la FFS (Figura 12).

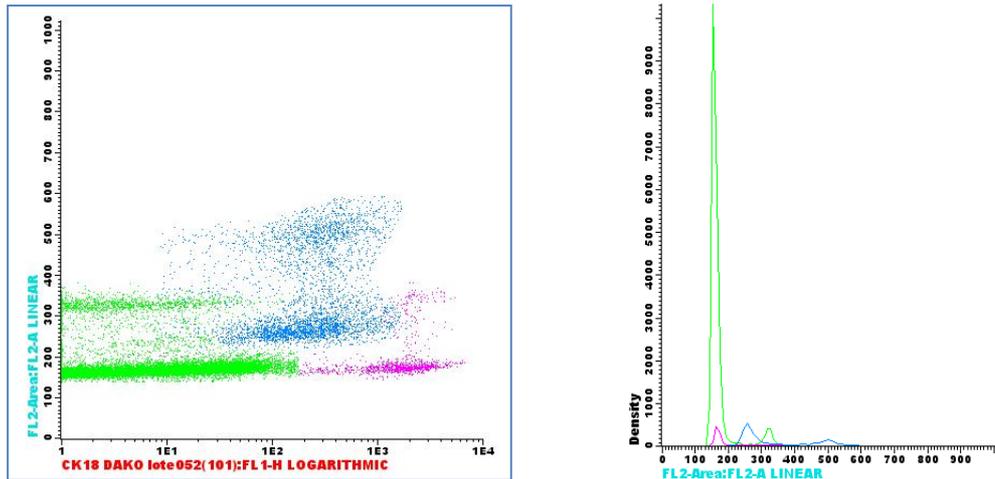


Figura 12.- Representación en "dot plot" e histograma que muestra el marcaje simultáneo de una muestra de tumor primario de mama con CK18 y cuantificación de ADN con Ioduro de propidio. En ella se pueden ver células epiteliales CK18++ diploides y células tumorales CK18+ débil aneuploides.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En la actualidad existe un interés creciente en el estudio de la enfermedad mínima residual en el cáncer de mama, y en especial en conocer el estado axilar de la manera más precisa posible, dadas las implicaciones pronósticas que esto conlleva. Por otro lado, y dado que hoy en día las actuaciones tienden a ser menos agresivas e intervencionistas, cada vez cobra más relevancia el conocimiento de las características del tumor que podrían predecir la mayor o menor probabilidad de afectación axilar. Todo esto, además, estaría enfocado a diseñar herramientas terapéuticas orientadas específicamente para cada subtipo tumoral, disminuyendo la iatrogenia y aumentando la efectividad de los tratamientos.

Esta estrategia es especialmente importante en grupos de pacientes ya seleccionados por su buen pronóstico a priori, como son los estadios iniciales de la enfermedad. Por este motivo, en este trabajo el planteamiento ha sido explorar, en pacientes con cáncer de mama de estadios I y II, nuevos parámetros que puedan ayudar a ofrecer vías de tratamiento más adaptadas a cada situación clínica y donde sea posible intensificar terapias en pacientes con mayor riesgo y evitar efectos colaterales en pacientes con un mejor pronóstico de base. Aunque el abanico de técnicas disponibles para ello es amplio, hoy en día sigue sin definirse una metodología ideal, descubriéndose diferentes ventajas y limitaciones para cada uno de los métodos empleados hasta la fecha, tanto en la investigación de la presencia de células tumorales en el ganglio centinela como en la búsqueda de nuevos factores pronósticos en el momento del diagnóstico de la enfermedad.

Como se ha comentado en la introducción, en las últimas dos décadas, el inmunofenotipaje por citometría de flujo ha demostrado ser de gran utilidad en hemopatías y en este momento el inmunofenotipo por citometría de flujo, conjuntamente con la cuantificación de ADN, se está usando tanto con fines diagnósticos y pronósticos como para el seguimiento de muchas enfermedades y muy especialmente para la evaluación del nivel de respuesta al tratamiento quimioterápico recibido. Sin embargo, por el momento, seguimos sin disponer de estudios relevantes en los que se analice la aplicabilidad y utilidad de la citometría de flujo para la investigación de la presencia de células tumorales aisladas y micrometástasis en ganglios centinela de pacientes diagnosticadas de cáncer de mama, y relativamente poca información en referencia a factores pronósticos de base en dicha patología.

Con estos antecedentes, en el presente trabajo nos propusimos investigar la aplicabilidad y utilidad clínica de la citometría de flujo multiparamétrica mediante el marcaje simultáneo de CK18 y ADN para la detección de enfermedad mínima residual en el ganglio centinela en pacientes con cáncer de mama en estadios iniciales, así como para

la búsqueda de factores pronósticos adicionales que puedan ayudar a la instauración de tratamientos más adaptados a cada situación en las mismas pacientes.

Para ello, nos planteamos los siguientes objetivos:

2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la utilidad clínica del marcaje simultáneo de CK18 y ADN por citometría de flujo (Citometría de flujo multiparamétrica o CMFm) en el carcinoma de mama en estadios I y IIA.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar con la citada técnica los tumores primarios de todas las pacientes con el cometido de categorizarlos en cuanto a patrón de expresión de CK18 y ploidía, así como estudio del ciclo celular, calculando los parámetros de proliferación celular (Síntesis y Fracción de la Fase S).
2. Analizar los ganglios centinela con la misma técnica, buscando células con los patrones obtenidos en el tumor primario.
3. Comparar los parámetros obtenidos con dicho marcaje entre el tumor primario y los ganglios centinela infiltrados, para buscar patrones de diseminación tumoral.
4. Evaluar el poder de detección de infiltración del ganglio centinela de la CMFm en comparación con las técnicas convencionales de Inmunohistoquímica.
5. Evaluar el valor pronóstico de los parámetros obtenidos por CMFm en el tumor primario (patrón de expresión de CK18, ploidía de ADN y proliferación de la célula tumoral) mediante la comparación con otros factores pronósticos clásicos presentes en el mismo y su asociación o no con la aparición de metástasis en el ganglio centinela, para tratar de identificar qué características tumorales podrían predecir su mayor potencial metastásico.

6. Analizar tanto el valor pronóstico de los parámetros obtenidos por CMFm en el tumor primario como los resultados de infiltración del ganglio centinela en términos de evolución clínica, valorando tanto la incidencia de eventos adversos (recaída local, metástasis a distancia) como la supervivencia global y libre de enfermedad.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 POBLACIÓN DEL ESTUDIO

Para formar parte del estudio, se incluyeron consecutivamente todas las pacientes diagnosticadas de cáncer de mama en estadios iniciales (I y II), sin sospecha clínica de metástasis axilares (N0) ni de metástasis a distancia (M0) desde marzo de 2001 a marzo de 2005. Preoperatoriamente, y con la finalidad de descartar metástasis a distancia, a todas las pacientes se les realizó radiografía de tórax, ecografía hepática y gammagrafía ósea.

3.1.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- Tamaño tumoral clínico o radiológico menor de 5 centímetros (T1-2)
- Ausencia de adenopatías palpables en el momento del diagnóstico (N0).
- Ausencia de metástasis a distancia en el momento del diagnóstico (M0).
- No presenta ninguno de los criterios de exclusión.

3.1.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- Tamaño tumoral clínico o radiológico mayor de 5 centímetros.
- Adenopatías axilares palpables.
- Cirugía amplia previa (mamoplastia de aumento o de reducción).
- Tratamiento con quimioterapia ó radioterapia previo.
- Embarazo o lactancia.
- Multifocalidad/multicentricidad del tumor conocida.
- Sexo masculino.
- Negativa de la paciente a participar en el estudio.

3.1.3 TRATAMIENTO RECIBIDO

Tras firmar un consentimiento informado, el tratamiento quirúrgico del tumor mamario consistió en una tumorectomía amplia (cirugía conservadora) o mastectomía. En todas las pacientes se realizó biopsia del ganglio centinela con estudio anatomopatológico intraoperatorio. Sólo se realizó linfadenectomía axilar completa cuando el resultado de la biopsia fue positivo en el estudio intraoperatorio y/o postoperatorio. A las 3-4 semanas de la intervención las pacientes recibieron tratamiento adyuvante quimiohormonoterápico según los protocolos establecidos. Posteriormente,

las pacientes con tratamiento quirúrgico conservador recibieron radiación mamaria con telecobalto (50 Gy en 25 sesiones).

3.2 ESTUDIOS DEL TUMOR PRIMARIO Y EL GANGLIO CENTINELA

3.2.1 CIRUGÍA DEL TUMOR PRIMARIO

El diagnóstico inicial anatomopatológico del tipo de tumor se realizó previamente a la cirugía mediante PAAF o BAG en los tumores palpables o mediante biopsia con arpón en los tumores no palpables. La cirugía consistió en tumorectomía o mastectomía, según el protocolo entonces vigente en el hospital.

Cuando se realizó tumorectomía, la pieza extraída se incluyó en tinta china y se seccionó en el propio quirófano para valorar los bordes quirúrgicos. Si éstos se consideraron insuficientes, la cirugía se amplió hasta alcanzar niveles de resección óptimos. Posteriormente, la pieza se marcó para poder orientarla espacialmente y se envió al laboratorio de Anatomía Patológica.

3.2.2 BIOPSIA SELECTIVA DEL GANGLIO CENTINELA

Apyados en la fase de validación, que tuvo lugar en el año 2000, la biopsia del GC se realizó mediante la técnica combinada isotópica más colorante.

3.2.2.1 *Localización preoperatoria*

Se realizó un estudio linfogammagráfico previo a la cirugía (entre 3 y 18 horas antes) mediante inyección de una dosis de 74-111 MBq de sulfuro de renio coloidal marcado con Tecnecio-99m (Nanocis®), en un volumen máximo de 2 mL, de forma peritumoral en las lesiones palpables y periareolar/peritumoral en las lesiones no palpables. Se obtuvieron imágenes estáticas mediante gammacámara Elscint modelo Apex con en proyecciones anterior incluyendo tórax, para valorar el drenaje a la cadena de mamaria interna, y lateral hasta la visualización del GC entre 1 a 4 horas después de la inyección. Se marcó en la piel la zona donde se localizó el ganglio centinela, estando la paciente en la misma posición que en la mesa quirúrgica.

3.2.2.2 Localización intraoperatoria

Inmediatamente antes de la intervención (5-10 minutos) se inyectó subdérmicamente sobre la zona tumoral azul de isosulfán al 1% (Lymphazurin®).

Para la localización del ganglio centinela se realizó una incisión axilar transversal justo por debajo de la implantación del vello axilar si se realizó tratamiento conservador o en el trayecto axilar de la incisión prevista para realizar mastectomía.

Con disección roma se localizaron los conductos linfáticos teñidos de azul que se siguieron hasta localizar el ganglio linfático teñido de azul.

Mediante la técnica combinada (colorante más radiotrazador) se consideró éxito en la localización del ganglio centinela cuando se identificó un ganglio teñido de azul o en el que desembocara un conducto linfático teñido de azul o cuando mediante la sonda manual de detección de rayos gamma (Navigator) se localizó un ganglio con un contaje superior a diez veces la radioactividad basal. Después de la extirpación del ganglio, se volvió a medir la radioactividad de la axila para descartar la existencia de otros ganglios centinelas adicionales.

3.2.3 ANÁLISIS HISTOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO DEL TUMOR PRIMARIO

En el laboratorio de Anatomía Patológica, el tumor se fijó en formol durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo, se incluyó en parafina durante 24 horas más. Más tarde se realizaron cortes histológicos de la pieza, en los que se llevó a cabo tanto la tinción con hematoxilina-eosina para el estudio citológico del tumor como el estudio inmunohistoquímico para determinar la presencia de receptores de estrógenos, progesterona, cErb-2 y p53.

3.2.4 ANÁLISIS HISTOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO DEL GANGLIO CENTINELA

3.2.4.1 Estudio histopatológico intraoperatorio

Se realizó en primer lugar un examen macroscópico del ganglio centinela mediante bisección si éste fue menor de 5 mm o mediante secciones de 2 mm si fue mayor, buscando focos metastásicos macroscópicos, en cuyo caso y para su confirmación, se realizaron improntas con tinción con hematoxilina-eosina. Si este primer

estudio fue negativo, se realizaron improntas y tinción con hematoxilina-eosina del resto de las secciones. Si de nuevo el estudio en las nuevas improntas fuera negativo, se hizo inmunocitoquímica en nuevas improntas, realizando la técnica con la citoqueratina Cam 5.2 o la citoqueratina EA1/EA, rápidas, en 7 minutos. Si no se observaron micrometástasis, el estudio intraoperatorio fue dado como negativo, reservándose el ganglio centinela para estudio diferido y no realizándose linfadenectomía axilar. Si se observaron micrometástasis, se indicó la realización de linfadenectomía axilar.

Una muestra de una de las partes biseccionadas del ganglio se reservó para el estudio citométrico, una vez finalizado el estudio intraoperatorio del ganglio centinela. En el resto del ganglio se realizó el estudio histopatológico diferido.

3.2.4.2 Estudio histopatológico diferido

La porción del ganglio centinela reservada para su estudio anatomopatológico se incluyó en parafina, realizándose múltiples cortes histológicos para su estudio.

En primer lugar, el ganglio se seccionó por la mitad, pues en la línea media es donde se encuentra el mayor número de linfáticos aferentes y por tanto, donde es más probable encontrar los primeros depósitos de células tumorales. Ante la variabilidad del tamaño del ganglio centinela se diseñó un protocolo que tenía en cuenta el número de láminas que se estudiaban en vez del número de cortes, entendiéndose que en cada lámina se colocaba el número máximo de cortes, que podía llegar a ser de 12. De cada sección del ganglio se estudiaron 21 láminas, 15 de ellas con hematoxilina-eosina. Si alguna fue positiva para metástasis, se emitió el diagnóstico de ganglio centinela metastásico. Si fueron negativas, las 6 láminas reservadas e intercaladas entre las 15 anteriores se tiñeron con inmunohistoquímica para la detección de citoqueratinas. Se considero que el ganglio centinela fue negativo si también hubo ausencia de metástasis.

3.2.4.3 Tinción con inmunohistoquímica para citoqueratinas

La técnica de **tinción rápida para citoqueratina CAM 5.2** se realizó manualmente y consistió en:

- Aclarado con agua y PBS
- Paso por bloqueante sérico normal (30 segundos)
- Tinción con anti-citoqueratina CAM 5.2 (2 minutos)
- Aclarado con PBS
- Reacción con anticuerpo secundario (1 minuto)
- Aclarado con PBS
- Paso por el complejo ABC Peroxidasa (1 minuto)
- Aclarado con PBS

- Paso por cromógeno DAB (2 minutos)
- Aclarado con agua
- Tinción con hematoxilina de Meyer modificada (20 segundos)
- Aclarado con agua y PBS
- Deshidratación, limpieza y montaje.

El **estudio diferido para citoqueratina** se realizó de manera automática (OptimaxPlus, BioGenex) y fue controlado informáticamente (6000 AutoStainer). Se utilizaron los mismos reactivos que en la tinción rápida.

En caso de hallar metástasis en algún corte, se indicó si ésta correspondía a células tumorales aisladas (1-10 células, detectadas por inmunohistoquímica), micrometástasis ocultas (colonias tumorales de 10-20 células en región subcapsular), micrometástasis (metástasis menor de 2 mm) o metástasis (mayor de 2 mm). Esta evaluación microscópica fue llevada a cabo por dos anatomopatólogos de forma independiente.

3.2.5 ESTUDIOS CON CITOMETRÍA DE FLUJO MULTIPARAMÉTRICA

3.2.5.1 *Obtención de muestras celulares*

Desde el laboratorio de Anatomía Patológica se tomaron muestras en fresco del tumor primitivo mamario y del ganglio centinela y se enviaron en suero salino al laboratorio de citometría.

Las muestras de tejido tumoral (tumor primario y ganglio centinela) recibidas en fresco se depositaron en una solución de tampón citrato pH 7.6 a 25°C, preparada del siguiente modo: sacarosa en una concentración final de 0.25 M, citrato trisódico dihidratado 0.04M y dimetilsulfóxido (DMSO) al 5% en agua destilada. En esta solución las muestras se disgregaron mecánicamente, primero con pinzas y bisturí y posteriormente mediante aspiraciones repetidas con pipeta Pasteur, obteniéndose una suspensión celular homogénea. Tras dejar sedimentar un par de minutos a temperatura ambiente, se recogió el sobrenadante y se centrifugó a 540 g durante 5 minutos. Tras esta centrifugación se decantó el sobrenadante y el botón celular resultante se congeló, previa identificación de la muestra, a -20 °C hasta su estudio.

3.2.5.2 *Marcaje con anticuerpos monoclonales anti-citoqueratinas*

Las muestras se descongelaron a temperatura ambiente.

Una vez descongelado el botón celular se añadieron 15 µL de un anticuerpo monoclonal anti-citoqueratina 18 (CK 18) conjugado con FITC, se agitó suavemente la muestra y se procedió a realizar una incubación durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, antes de proceder a la tinción del ADN.

3.2.5.3 **Tinción del ADN celular**

Para la tinción del ADN celular se empleó la técnica descrita por Vindeløv y cols. (245) con alguna modificación. Este método se basa en teñir el ADN con un compuesto fluorescente -ioduro de propidio (IP)- que se intercala entre la doble hélice de ADN. Para ello a partir de una solución base tamponada, se prepararon las 2 soluciones necesarias: solución B (que contiene RNAasa) y solución C (que contiene el colorante IP). Es importante reseñar que al realizar un marcaje anti CK18, no se utiliza la solución A, que contiene tripsina y digeriría la membrana celular.

Una de las ventajas de este método de tinción reside en que las dos soluciones anteriores se añaden a la muestra escalonadamente, una sobre otra, sin centrifugaciones, para evitar roturas y pérdidas celulares selectivas, algo especialmente crítico en células procedentes de tejidos sólidos. A continuación se describe la composición de cada solución:

- **Solución base:** citrato trisódico dihidratado 3.4 mM, Nonidet P40 (NP40) 0.1%, tetracloruro de espermina 1.5 mM y Tris (hidroximetil) aminometano 0.5 mM, en agua destilada; pH 7.6 a 25°C.

- **Solución B:** inhibidor de tripsina 0.5 g/l y ribonucleasa A 0.1 g/l, en la solución base; pH 7.6 a 25°C.

- **Solución C:** ioduro de propidio (IP) 0.42 g/l y tetracloruro de espermina 1g/l, en la solución base; pH 7.6 a 25°C. Esta solución se protegió de la luz durante su preparación, almacenamiento y uso.

Sobre el botón celular, ya marcado con el Ac antiCK18-FITC, se realizó la tinción del ADN.

Para la tinción de la muestra en primer lugar se añadieron 1.5 mL de la solución B y se incubó en oscuridad. Esta solución incorpora una ARNasa con el fin de eliminar el ARN celular de la muestra, ya que el marcador utilizado para teñir el ADN se podía unir tanto al ADN como al ARN. Pasados 10 minutos se añadieron 1.5 mL de la solución C, con el fluorocromo IP, y se mantuvo en oscuridad durante 15 minutos. Tras este periodo se procedió a la lectura en el citómetro de flujo.

La muestra teñida se almacenó a 4°C hasta el momento de la lectura en el citómetro, período que nunca superó las 2 horas.

3.2.6 ADQUISICIÓN Y ANÁLISIS DE LOS DATOS EN EL CITÓMETRO DE FLUJO

3.2.6.1 *Calibración del citómetro de flujo*

Periódicamente, o cuando se observaron desajustes o falta de linealidad en el citómetro, se realizó una calibración del mismo, siguiendo protocolos estandarizados y aprobados por los proveedores del equipo y la bibliografía de referencia. Para ello se emplean núcleos de eritrocitos de pollo y esferas plásticas fluorescentes (“calibrated balls”, Becton/Dickinson, San Jose, CA, EEUU). Para el control de la calibración y la compensación de fluorescencias se emplearon muestras de sangre periférica humana teñida con IP y el AcMc anti-CD15 (Becton/Dickinson); en todos los casos el coeficiente de variación obtenido para el pico de células en las fases G0/G1 se situó entre 2% y 4%, con CV para las muestras controles (sangres periféricas controles) inferiores a 3%. Esta configuración correcta del citómetro se almacenó en un fichero informático que se leía diariamente para realizar la lectura siempre en las mismas condiciones.

3.2.6.2 *Adquisición y análisis de muestra del tumor primario*

En el citómetro de flujo (FAScalibur®, Becton/Dickinson) se almacenó información sobre un mínimo de 100000 células para cada estudio empleando el programa informático CellQuest® (Becton/Dickinson). Al analizar, se realizó una selección de eventos que correspondían a células individuales mediante la eliminación de los restos de membranas, agregados celulares y otros contaminantes. Posteriormente, para cada población celular o clon tumoral se calculó el Índice de ADN (IADN), las fases de proliferación y el patrón de fluorescencia de CK18 (Figura 13).

En todas las muestras, para el análisis de los resultados se empleó el programa informático PAINT-A-GATE PRO® (Becton/Dickinson).

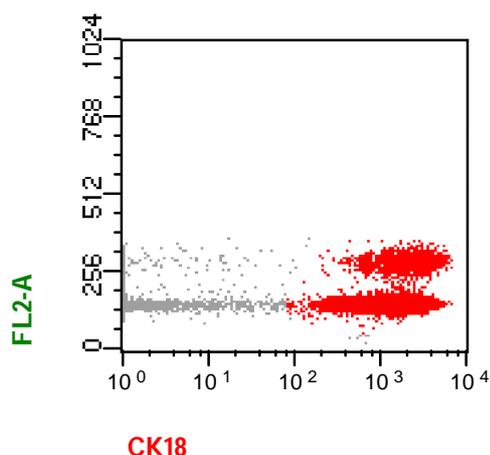


Figura 13.- Ejemplo representativo de la selección de las células CK+ (eventos en color rojo). En el eje x se representa el marcaje con la CK18 y en el eje Y el marcaje con IP, que se lee en el detector FL2 del citómetro.

3.2.6.3 Adquisición y análisis de muestras de ganglio centinela

En las muestras de ganglios centinela, en el citómetro de flujo (FAScalibur®, Becton/Dickinson) se almacenó información sobre un número de células que osciló entre 52×10^3 y 10^7 células para cada estudio, y que se correspondió con el total de la muestra disponible (hasta agotar tubo), excepto en aquellos casos en los que se detectó infiltración tumoral aparente y que, por tanto, no se requería incremento de la sensibilidad. Se adquirió empleando el programa informático CellQuest® (Becton/Dickinson).

Cuando durante la adquisición se visualizó infiltración tumoral aparente, la muestra se adquirió en modo "tubo total", es decir que se guardó información sobre la totalidad celular en un solo paso. En aquellos casos en que esto no fue así, es decir, que si había infiltración, sería mínima, la adquisición se realizó en doble paso: primero se adquirieron 20000 células en modo "tubo total" y en una segunda fase se adquirieron todas las células disponibles (hasta agotar el tubo) a través de una ventana de adquisición ("gate" de adquisición) en la zona de máxima probabilidad de aparición de células tumorales (células CK18 positivas) en el diagrama CK18/FL2-A (Figura 14), teniendo en cuenta el clon o clones detectados en el tumor primario, de manera que la búsqueda de células tumorales fuera aún más selectiva. En el único caso en el que las células tumorales carecían por completo de expresión de CK18 (Caso CK18 negativo), así como en aquellos en los que la expresión de CK18 fue débil, se realizó la adquisición del total de la muestra disponible en modo "tubo total" (sin "gate") igualmente hasta agotar el tubo.

Con el fin de establecer un número de células CK18+ a partir del cual considerar que un ganglio centinela estaba infiltrado, se realizó la misma determinación que en los casos problema en 33 muestras de ganglios controles (ganglios reactivos o correspondientes a enfermedades hematológicas con tejido reactivo residual, en cualquier caso no pertenecientes a tumores sólidos). El número total de células analizadas en las 33 muestras controles osciló entre 1.5×10^6 y 5×10^6 , con un valor medio de 1.1×10^6 células totales.

Como se comentó en el apartado anterior, para determinar la proporción de células tumorales presentes en el conjunto de la muestra, se realizó una selección de eventos que correspondían a células individuales en las que se eliminaron los restos de membranas, los agregados celulares y otros contaminantes. Posteriormente, se identificaron los diferentes patrones de fluorescencia para cada población o clon tumoral, en los estudios de tumores primarios. En los estudios de los ganglios centinela se revisó el fichero con la totalidad celular y se constató el porcentaje de infiltración si ésta era “aparente”. En caso contrario, en el fichero correspondiente a la población CK18positiva seleccionada se hizo un recuento de las células CK18+ y/o aneuploides y se calculó el porcentaje en base al número total de células analizadas.

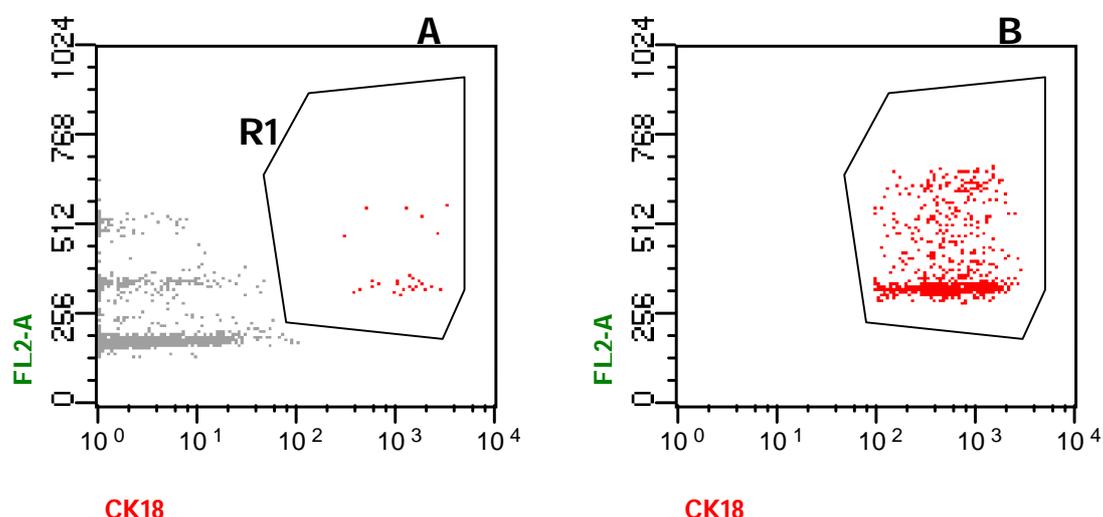


Figura 14.- Ejemplo representativo de la adquisición de información en dos pasos: 1) Sobre la celularidad global de la muestra (A) y 2) Tras la realización de una ventana electrónica (R1) de forma exclusiva sobre las células ck18+ presentes en la muestra (B).

Se consideró que un ganglio estaba infiltrado cuando se detectaron más de 10 “eventos” CK18+ y/o aneuploides. Se consideró que menos de 10 eventos no podían

constituir infiltración en base a las publicaciones al respecto (221, 246) y también porque en ninguno de los 33 ganglios controles analizados se encontraron más de 10 eventos positivos.

3.3 ESTUDIO DE LA SUPERVIVENCIA

El período de reclutamiento de las pacientes comenzó en febrero de 2001 y finalizó en abril de 2005 y el seguimiento se inició a partir de la intervención quirúrgica.

Para estudiar la supervivencia de las pacientes y la supervivencia libre de enfermedad hasta la aparición de metástasis o recaída local se realizó una revisión anual de las historias clínicas. Todos los datos se fueron registrando en una base de datos creada para tal fin (Microsoft Excel[®] 4.0, Microsoft).

La **SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD** se definió como el intervalo entre la intervención quirúrgica y la aparición de la primera recurrencia local o metástasis a distancia.

La **SUPERVIVENCIA GLOBAL** se definió como el intervalo de tiempo transcurrido entre la intervención quirúrgica inicial y el tiempo final del seguimiento, es decir, entre la intervención quirúrgica y la última observación clínica o el exitus debido al cáncer de mama. Las pacientes fallecidas durante el período de seguimiento por causas diferentes al cáncer de mama no fueron contabilizadas como exitus, sino como pérdida de seguimiento a partir de la fecha del exitus por otro motivo diferente al de la enfermedad a estudiar.

3.4 METODOS ESTADÍSTICOS

Todos los datos se introdujeron en una base de datos específicamente diseñada para este estudio empleando el programa Microsoft Excel[®] 4.0 (Microsoft). Para todas las variables continuas se calculó la media, mediana, desviación estándar y rango empleando el paquete estadístico SPSS[®] (SPSS 15.0 Inc., Chicago, IL, USA).

Tanto la adquisición como el análisis de datos se realizaron en un citómetro de flujo FASCalibur[®] (Becton/Dickinson) empleando los programas informáticos CellQUEST[®] (Becton/Dickinson) y PAINT-A-GATE PRO[®] (Becton/Dickinson), respectivamente, según lo descrito en los apartados anteriores.

3.4.1 ESTUDIO DESCRIPTIVO DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO PATOLÓGICAS DE LAS PACIENTES Y DE LOS PATRONES DE EXPRESIÓN DE CK18, PLOIDÍA DE ADN Y CICLO CELULAR TANTO EN EL TUMOR PRIMARIO COMO EN LOS GANGLIOS CENTINELAS

Los parámetros cuantitativos relacionados con las características clínico-patológicas de las pacientes (edad, tamaño tumoral, etc.) se estudiaron mediante el cálculo de la media, mediana y desviación típica. Siempre que fue posible, estos parámetros se transformaron en cualitativos agrupándolos en intervalos para facilitar su manejo estadístico.

3.4.2 COMPARACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS PATRONES DE EXPRESIÓN DE CK18 Y PLOIDÍA DE ADN DE LAS METÁSTASIS EN GANGLIO CENTINELA RESPECTO AL TUMOR PRIMARIO

Para estudiar las características del tumor primario y de las metástasis de éste en el ganglio centinela se realizó un estudio de concordancia utilizando el test χ^2 . Se compararon los porcentajes de CK18 y la ploidía del ADN presentes en el tumor primario y se comprobó su presencia o no en las metástasis a nivel del ganglio centinela.

Los valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

3.4.3 COMPARACIÓN DE LA TÉCNICA INMUNOHISTOQUÍMICA CON LA CMFm PARA LA VALORACIÓN DE AFECTACIÓN METASTÁSICA EN EL GANGLIO CENTINELA

Como una primera aproximación al análisis del valor de la CMFm en la detección de afectación metastásica en el ganglio centinela se realizó un estudio de validez de prueba diagnóstica, comparándola con el actual *gold standard* que es el estudio anatomopatológico mediante inmunohistoquímica y realizando un cálculo de la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de la CMF respecto a la IHQ.

Como desde el punto de vista teórico, y basándonos en otros campos donde la CMFm está ya instaurada con fines diagnósticos, la CMFm apunta como una técnica más sensible que la IHQ, en un segundo paso analizamos con detenimiento los casos discordantes entre la CMFm y la IHQ utilizando la evolución clínica de las pacientes

(aparición de eventos adversos) como *gold standard* clínico. Esto se realizó mediante tablas de contingencia, utilizando el test χ^2 para calcular la significación estadística.

Para el estudio de los casos discordantes entre la CMFm y la IHQ utilizando la evolución clínica de las pacientes (supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad), se utilizó el método de Kaplan Meier.

3.4.4 ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS Y FACTORES PREDICTIVOS DEL TUMOR PRIMARIO Y SU ASOCIACIÓN O NO CON METÁSTASIS EN EL GANGLIO CENTINELA

Para valorar la asociación entre determinadas características tumorales y la presencia o no de metástasis a nivel del ganglio centinela se realizó un análisis univariante en un primer paso, mediante el test χ^2 . Se consideró como variable dependiente la presencia o no de metástasis en el ganglio centinela. Las variables independientes fueron las características del tumor susceptibles de modificar la probabilidad de infiltración ganglionar.

En un segundo paso se realizó un análisis multivariante, comparando las características que resultaron ser estadísticamente significativas para ponderar cuáles de ellas podrían tener más peso o más influencia a la hora de predecir la aparición de metástasis en el ganglio centinela, basándonos en las características del tumor primario.

Los valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

3.4.5 ESTUDIO DE LA SUPERVIVENCIA GLOBAL Y SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD. COMPARACIÓN CON LAS VARIABES DEL TUMOR PRIMARIO

La estimación de la función de supervivencia se ha realizado mediante el método de Kaplan-Meier, calculando la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad para cada una de las características de la enfermedad.

Para el análisis de aquellos factores que potencialmente podrían modificar la supervivencia se ha empleado la regresión de Cox. El valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

4. RESULTADOS

4.1 DESCRIPCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE LAS PACIENTES, SEGUIMIENTO Y ESTIMACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA

4.1.1 POBLACIÓN DEL ESTUDIO

4.1.1.1 *Edad*

La mediana de edad de las pacientes incluidas en este estudio fue de 56 años, con una desviación estándar de 15.2 años y un rango de 31 a 89 años.

Para facilitar los cálculos estadísticos, la variable edad se transformó en una variable cualitativa, clasificándola en 5 intervalos (<40 años, 40-49 años, 50-59 años, 60-69 años y >70 años) (Tabla 9).

4.1.1.2 *Sexo*

El 100% de las pacientes de la muestra fue de sexo femenino, en base a uno de nuestros criterios de inclusión.

4.1.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICOPATOLÓGICAS DEL TUMOR

4.1.2.1 *Tamaño tumoral*

La media del tamaño tumoral en los tumores primarios fue de 2,5 cm, con una desviación estándar de 1.1 cm. El rango del tamaño tumoral se mantuvo entre 0.3 y 5 cm.

Dado que el tamaño es una variable cuantitativa continua, de cara al manejo estadístico se utilizó el tamaño asociado al estadiaje TNM. Un 42.6% de los tumores (52 de ellos) se incluyó en el grupo T1 (tumores mayores de 1 mm y menores de 20 mm). El 57.4% restante (70 de ellos) se incluyó en el grupo T2 (tumores mayores de 20 mm y menores de 50 mm) (Tabla 9).

4.1.2.2 *Tipo histológico*

La mayor parte de los tumores incluidos en nuestro estudio fueron carcinomas ductales infiltrantes (101 tumores, 80.8%). Un 9.6% se incluyeron en la categoría de carcinomas lobulillares infiltrantes (12 tumores), y tan sólo un 3.2% (4 tumores) se clasificaron como carcinomas ductales in situ. Un tumor (0.8%) presentó componente mixto de carcinoma ductal infiltrante y lobulillar infiltrante y el 5.6% restante (7 tumores) lo formaron tumores de otro tipo, entre ellos un carcinoma medular, cinco carcinomas mucinosos y un carcinoma sarcomatoide (Tabla 9).

4.1.2.3 Grado histológico

El grado histológico fue calculado por el equipo de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Salamanca siguiendo la modificación de Nottingham (72) al sistema de Scarff-Bloom-Richardson (247), en todos los tumores clasificados como carcinoma ductal infiltrante (CDI) y carcinoma in situ (CIS). No fue valorado en el resto de los casos (carcinoma lobulillar, carcinoma medular, carcinoma mucinoso y carcinoma sarcomatoide) ya que las características intrínsecas del tipo de tumor pueden ser consideradas variables pronósticas en sí mismas. A pesar de que en la actualidad el análisis del grado tumoral forma parte del protocolo de estudio de todos los tipos de tumores mamarios, en el momento del reclutamiento de las pacientes incluidas en este estudio (2001-2004), dicho análisis no formaba parte del protocolo de estudio de los tumores no incluidos en las categorías CDI y CIS por los motivos antes mencionados. El grado histológico tumoral no pudo estimarse en 18 casos debido a las características histológicas del tumor (Tabla 9).

Del total de los tumores en los que el grado fue valorado (107), el 15.0% (16 de ellos) fueron clasificados como grado I, el 43.9% (47 tumores) como grado II y el 41.1% restante (44 tumores) como grado III.

4.1.2.4 Receptores de Estrógeno (RE)

Los RE no pudieron estudiarse en 6 casos. Del resto, la mayor parte de los tumores incluidos en el estudio fueron RE positivos (94 tumores, 79.0% del total). Veinticinco tumores fueron RE negativos (21% del total) (Tabla 9).

4.1.2.5 Receptores de Progesterona (RP)

En 5 casos los RP no pudieron ser estudiados. Al igual que en el apartado anterior, la mayor parte de los tumores del estudio fueron RP positivos (89 tumores, 74.2% del total). Treinta y un tumores fueron RP negativos (25.8% del total) (Tabla 9).

4.1.2.6 p53

El p53 no pudo estudiarse en 22 casos. Hubo 37 casos con tumores p53 positivos (35.9%) y 66 tumores p53 negativos (64.1%) (Tabla 9).

4.1.2.7 Her2-Neu

El Her2-neu no pudo estudiarse en 17 tumores. Tan sólo un 14.8 % de los tumores estudiados (16 tumores) fueron positivos para el Her2-neu, siendo el resto (92 tumores, 85.2 %) negativos para este oncogén (Tabla 9).

Tabla 9.- Descripción de las características de las pacientes y las variables de los tumores.

VARIABLE	Nº de pacientes	%
EDAD (n=125)		
<40	16	12.8
40-49	23	18.4
50-59	30	24.0
60-67	23	18.4
>70	33	26.4
TAMAÑO TUMORAL (n=122)		
T1	52	42.6
T2	70	57.4
TIPO HISTOLÓGICO (n=125)		
CDI	101	80.8
CLI	12	9.6
CDI+CLI	1	0.8
CDIS	4	3.2
OTROS	7	5.6
GRADO HISTOLÓGICO (n=107)		
I	16	15.0
II	47	43.9
III	44	41.1
RE (n=119)		
+	94	79.0
-	25	21.0
RP (n=120)		
+	89	74.2
-	31	25.8
p53 (n=103)		
+	37	35.9
-	66	64.1
Her2-neu (n=108)		
+	16	14.8
-	92	85.2
PLOIDÍA (n=125)		
DIPLOIDE	57	45.6
ANEUPLOIDE	68	54.4
FFS (TERCILES) (n=121)		
BAJA	40	33.1
MEDIA	40	33.1
ALTA	41	33.9

4.1.3 SEGUIMIENTO DE LAS PACIENTES

4.1.3.1 Datos de seguimiento

En el momento de cerrar este estudio, la media de seguimiento era de 112,8 meses (DE: 18) con un seguimiento mínimo de 44,4 y máximo de 148,8 meses. Durante el curso del estudio se perdió el seguimiento de 8 pacientes (Tabla 11).

4.1.3.2 Recaídas

De los 120 casos en los que pudo realizarse seguimiento, en el momento de cerrar este estudio se habían producido 10 recaídas locales (8% del total) y 19 metástasis a distancia (15.2%) (Tabla 10). En dos pacientes se produjo recaída local y metástasis a distancia simultáneamente.

4.1.3.3 Exitus

En el momento de cerrar el estudio se habían producido 15 fallecimientos (12.5%) como consecuencia de la enfermedad (Tabla 10) y otros cinco fallecimientos (4.2%) por causas ajenas a la misma que fueron excluidos del estudio de la supervivencia global para evitar interferir con los datos reales de mortalidad por cáncer de mama.

Tabla 10.- Descripción del número (N) y porcentaje (%) de eventos adversos en nuestro grupo de estudio (n=120).

Evento adverso	N	%
Recaída local	10	8
Metástasis a distancia	19	15.2
Exitus	15	12.5

4.1.4 ESTIMACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA GLOBAL (SG) Y LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD (SLE), RECAÍDA LOCAL (RL), METÁSTASIS A DISTANCIA (MTS) Y EXITUS. DATOS GLOBALES.

La supervivencia libre de enfermedad (SLE) a los 5 y 10 años para el grupo total de pacientes (n=125) fue del 86.8 y 74.8%. La supervivencia global (SG) para el mismo grupo fue del 92.9 y 88.3%, respectivamente.

Los tiempos globales de la supervivencia libre de enfermedad, la supervivencia global, el tiempo hasta la aparición de las metástasis a distancia, el tiempo hasta la recaída local y el exitus están expresados en meses y se exponen a continuación en la Tabla 11.

Tabla 11.- Valores de los tiempos globales de las variables relacionadas con el seguimiento, la supervivencia y eventos adversos de la enfermedad (meses).

	Media	Mediana	DT	Mínimo	Máximo
Seguimiento	112.8	112.32	18	44.4	148.8
SLE	99.16	105.36	32.74	7.92	149.16
SG	106.56	108.72	26.06	13.32	149.16
T hasta MTS	48.68	37.08	33.59	7.92	112.32
T hasta RL	56.51	61.86	28.94	17.40	95.16
T hasta EXITUS	61.04	57.06	30.49	13.32	124.56

4.2 DETERMINACIÓN DE LOS PATRONES DE EXPRESIÓN DE CK18, PLOIDÍA DE ADN Y CICLO CELULAR POR CITOMETRÍA DE FLUJO (CMFm) EN EL TUMOR PRIMARIO

Como ya se ha comentado en la introducción y en material y métodos, en las pacientes incluidas en este estudio se ha estudiado el tumor primario para definir los patrones de expresión de CK18 y ploidía del tumor con el fin de poderlos usar después para buscar infiltración tumoral en los ganglios centinela. Además, en los tumores primarios se ha calculado, en la misma determinación por citometría de flujo, el índice de ADN de cada clon tumoral y la fase de proliferación celular del tumor con la finalidad de

detectar grupos de riesgo, algo especialmente importante en tumores ya seleccionados por su buen pronóstico a priori (estadios T1 y T2).

4.2.1 EXPRESIÓN DE CK18 EN TUMOR PRIMARIO

Se detectó expresión de CK18 en más de 20 % de las células tumorales en todos los tumores estudiados excepto tres casos (122/125, 98%). La media de expresión de CK18 en el total de los casos fue de 79% (DE: 27%), con valores comprendidos entre 0% y 100%. Ciento siete casos (86%) mostraron expresión de dicha molécula en más del 50% de las células (Tabla 12).

Tabla 12.- Expresión de CK18 en el tumor primario. Resultados expresados como número (N) y % de casos.

Expresión de CK18 en el tumor primario (N=125)		
	N	(%)
CK18>20% células	122	98
CK18>50% células	107	86
<i>Media CK18 (N=125): 79 ± 27% (Min: 0%; max: 100%)</i>		

El hecho de que la CK18 se exprese en la mayoría de los tumores y, con frecuencia, con alta intensidad de expresión, ha permitido usar este marcador como identificativo de célula tumoral en los ganglios centinela, al carecer este tejido, en condiciones normales, de células CK18 por tratarse de un tejido hematopoyético. Respecto al patrón de expresión de CK18, la mayoría de los clones tumorales expresan la CK18 con una intensidad de fluorescencia inferior o superior a la de las células epiteliales normales (Figura 13). Este hallazgo nos ha permitido servirnos del patrón de expresión de CK18 de cada tumor primario para buscar células tumorales en los ganglios centinela. Sin embargo, al no haber utilizado un método cuantitativo absoluto para medir intensidad de fluorescencia, no mostramos resultados numéricos de este hecho. El patrón de intensidad de expresión de CK18 se ha valorado por comparación de diagramas de expresión de unas poblaciones y otras (medidas relativas), no en base a los canales de fluorescencia (Figura 15).

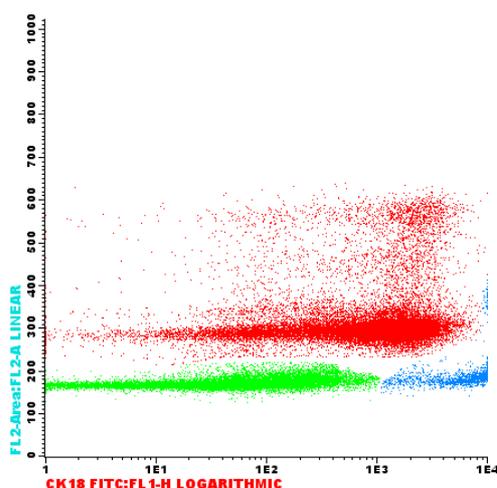


Figura 15.- Representación en "dot plot" de un tumor primario aneuploide. En verde se han señalado las células normales no epiteliales (CK18-) presentes en el tumor primario; en azul están seleccionadas las células epiteliales, probablemente normales (CK18++), y en rojo las células tumorales CK18+.

4.2.2 PLOIDÍA DE ADN

El 54.4% de los tumores presentaba algún clon tumoral aneuploide (68 tumores) y en el 45.6% (57 tumores) todas las células tumorales fueron diploides (Tabla 14).

En la Tabla 13 se puede ver que en la mayoría de los tumores se detecta una población celular diploide (113/125 casos) que por diversas razones (selección de zona tumoral para envío al laboratorio de citometría, expresión de CK18 compatible con tumor y características de FSC/SSC sugerentes de célula tumoral) asumimos que es tumoral. Este clon tumoral diploide coexiste con frecuencia con otros clones tumorales aneuploides.

Tres casos (2.4%) mostraron hipoploidía de ADN, en 14 casos (11.2%) se detectaron IADN entre 1.01 y 1.19, en 23 casos (18.4%) IADN entre 1.20 y 1.59, en 26 casos (20.8%) IADN entre 1.60 y 1.89, en 20 casos (16%) IADN entre 1.90 y 2.09 (catalogados como tetraploides) y en 15 casos (12%) se detectó algún clon con células hipertetraploides, es decir con un IADN igual o superior a 2.1 (Tabla 13).

La aneuploidía de ADN pudo usarse, por tanto, como el segundo marcador tumoral (el primero fue la expresión de CK18, ausente en las células ganglionares normales), para buscar células tumorales en los ganglios centinela al menos en el 54.4% de los casos, es decir, aquellos con al menos un clon tumoral aneuploide (Tabla 14).

Tabla 13.- Presencia de clones diploides, hipodiploides e hiperdiploides con diferentes índices de ADN en la serie de tumores primarios.

Ploidía	Rango de Índice de ADN	Número de casos (%)
Clon diploide	IADN=1	113/125 (90.4%)
Clon hipodiploide	IADN<1	3/125 (2.4%)
Clon hiperdiploide	1.19<IADN>1.01	14/125 (11.2%)
Clon hiperdiploide	1.59<IADN>1.20	23/125 (18.4%)
Clon hiperdiploide	1.89<IADN>1.60	26/125 (20.8%)
Clon hiperdiploide	2.09<IADN>1.90	20/125 (16%)
Clon hiperdiploide	IADN>2.10	15/125 (12%)

Datos expresados como porcentaje de casos que presentaron al menos un clon con la ploidía señalada, independientemente de que otros clones estuvieran presentes en el mismo tumor.

La búsqueda de infiltración tumoral en los ganglios centinela se abordó con los datos de patrón de CK18 y ploidía, en su conjunto.

4.2.3 NUMERO DE CLONES EN TUMOR PRIMARIO

Como se ha especificado en *Material y Métodos*, el criterio seguido para el establecimiento de clones tumorales en tumores primarios y en ganglios centinela ha sido el de la aparición de dos poblaciones tumorales bien diferenciadas en base a la ploidía y a la expresión de CK18, en conjunto, que pueden o no observarse como dos picos en el histograma FL2-Área.

En casi la mitad de los tumores primarios (61 casos, 48.8%) se detectó más de un clon tumoral y en 64 tumores (51.2%) se detectó un solo clon. Concretamente, en un 33.6% (42 tumores) se encontraron 2 clones, 3 clones en el 9.6% (12 tumores), 4 en el 2.4% (3 tumores) y 5 clones en el 3.2% (4 tumores) (Tabla 14).

Tabla 14.- Patrones de ploidía en los 125 tumores primarios estudiados.

Clones tumorales detectados en el tumor primario	Nº de casos (%)
D (sólo clon diploide)	57/125 (45.6%)
D + A (clon diploide + clon aneuploide)	39/125 (31.2%)
D + 2A (clon diploide + 2 clones aneuploides)	12/125 (9.6%)
D + 3A (clon diploide + 2 clones aneuploides)	3/125 (2.4%)
D + 4A (clon diploide + 3 clones aneuploides)	3/125 (2.4%)
A (sólo clon aneuploide)	7/125 (5.6%)
2A (2 clones aneuploides)	3/125 (2.4%)
5 A (5 clones aneuploides)	1/125 (0.8%)

4.2.4 PROLIFERACIÓN (FASE DE SÍNTESIS Y SÍNTESIS + G2/MITOSIS)

La proliferación de los tumores primarios se ha establecido en base a dos variables: el porcentaje de células en fase de síntesis (S) y la suma de los compartimentos fase de síntesis y de G2/Mitosis (S+G2/M). Ambos parámetros pudieron establecerse en 121 casos pues en los cuatro restantes fue imposible discriminar la fase de síntesis y/o síntesis más mitosis por superposición entre estas fases y la, o las poblaciones celulares con aneuploidía de ADN. La media (mediana, entre paréntesis) de porcentaje de células resultó ser de 4.8% (3.3%) y 10,2% (9.1%) para S y S+G2/M, respectivamente, con valores mínimos y máximos que oscilaron entre 0.4% y 19% y 0.6% y 42%, respectivamente (Tabla 15).

Tabla 15.- Parámetros estadísticos descriptivos referentes a la Síntesis y a la FFS (S+G2M).

	Media	Mediana	DT	Mínimo	Máximo
Síntesis (%)	4.8	3.3	4.1	0.4	19
FFS (S+G2M) (%)	10.2	9.1	7.2	0.6	42

Con la finalidad de adaptar la terminología a la más usada en la literatura hablaremos de Fracción de Fase de síntesis (FFS) o suma de fase de síntesis y mitosis (S+G2/M) en referencia a la proliferación celular de la población tumoral.

Siguiendo las recomendaciones de la Revisión de Consenso sobre la utilidad clínica de la Citometría de Flujo en el Carcinoma de Mama (131), tanto la S como la FFS (S+G2M), se transformaron en variables categóricas utilizando terciles (Tabla 16). Así, en el caso de la FFS, el p33 correspondió al 5.65% y el p66 a 12.55%. De esta manera se crearon 3 categorías para la FFS: FFS baja ($\leq 5.65\%$), FFS media (5.66-12.55%) y FFS alta ($>12.56\%$). Por su parte, el p33 y el p66 para la S fueron, respectivamente, 2% y 5,7%. Se crearon también 3 categorías de acuerdo a dichos terciles: S baja ($\leq 2\%$), S media (2.01-5.7%) y S alta ($>5.71\%$).

Tabla 16.- Valores de la Síntesis y la FFS (S+G2M) estratificadas en terciles.

Parámetro	Terciles	Categorías	Valores (%)
Síntesis	p33	Baja	≤ 2
	p33-p66	Media	2.01-5.70
	p66	Alta	>5.71
FFS (S+G2M)	p33	Baja	≤ 5.65
	p33-p66	Media	5.66-12.55
	p66	Alta	>12.56

4.2.5 RELACIÓN PLOIDÍA/FRACCIÓN DE FASE S

Al relacionar ploidía y la fracción de la fase de síntesis (FFS), se observó una relación estadísticamente significativa ($p < 0.0001$) entre ambos parámetros, siendo la mediana de la FFS para los tumores aneuploides de 12.60%, más del doble que en el caso de que el tumor no fuera aneuploide (5.40%). Esta relación se observó en todos los percentiles estimados (Tabla 17).

Tabla 17.- Relación entre la ploidía y la FFS en los diferentes percentiles estudiados.

	Fracción de la Fase de Síntesis (%)					p < 0.0001
	Media	Mediana	p33	p66	p99	
Diploides	6.54	5.40	4.01	6.50	24.30	
Aneuploides	13.23	12.60	10.00	15.04	42.00	

También se encontró una asociación estadísticamente significativa ($p < 0.0001$) entre la FFS estratificada en terciles y la ploidía de ADN en los tumores primarios. Los tumores con FFS baja fueron mayoritariamente diploides, mientras que la mayor parte de los tumores aneuploides se asociaron a una FFS media/elevada (Tabla 18).

Tabla 18.- Relación entre la ploidía y la FFS al estratificarla en terciles.

	FFS (Terciles)			Total	
	Baja	Media	Alta		
Diploides	30 (75.0%)	17 (42.5%)	7 (17.1%)	54	
Aneuploides	10 (25.0%)	23 (57.5%)	34 (82.9%)	67	$p < 0.0001$
Total	40	40	41	121	

Datos expresados como número de casos (% entre paréntesis).

4.3 UTILIDAD DE LOS PATRONES DE EXPRESIÓN DE CK18 Y PLOIDÍA DE ADN (CMFm) PARA LA DETECCIÓN DE INFILTRACIÓN TUMORAL DE LOS GANGLIOS CENTINELA

4.3.1 DETECCIÓN DE INFILTRACIÓN TUMORAL POR CMFm EN EL GANGLIO CENTINELA

4.3.1.1 *Numero de ganglios analizados*

En total se estudiaron 155 ganglios centinela, correspondientes a las 125 pacientes, al menos uno por paciente. En 97 casos se estudió un solo ganglio centinela (77% del total), dos ganglios en 26 casos (21%) y 3 ganglios en 2 (2%).

4.3.1.2 *Ganglios controles*

Un total de 33 ganglios linfáticos procedentes de pacientes con adenopatías reactivas (22 pacientes) o con procesos linfoproliferativos crónicos (11 pacientes) se estudiaron en paralelo y se usaron como ganglios controles. El número total de células analizado (media \pm 1SD) en las muestras control fue de $1.1 \times 10^6 \pm 1.3 \times 10^6$ células, con un rango de 1.5×10^4 a 5×10^6 . En ninguno de los ganglios controles se encontró una población celular aneuploide ni un conjunto de eventos CK18+ superior a 6, homogéneo y que se pudiera corresponder con células CK18+.

4.3.1.3 Casos con infiltración ganglionar

En 55 pacientes de las 125 estudiadas (44%) alguno de los ganglios mostró infiltración tumoral, considerada como presencia de 10 o más células CK18+ y/o aneuploides. En las restantes 45 pacientes (36% del total) no se detectó ningún clon tumoral en el estudio del ganglio centinela.

El número total de células analizado (media \pm 1SD) en los casos con infiltración ganglionar fue de $7.5 \times 10^5 \pm 1.5 \times 10^6$ células, con un rango de 4.7×10^4 a 1×10^7 .

4.3.1.4 Número de clones en ganglio centinela

Analizando en detalle los casos con infiltración ganglionar por células tumorales por citometría de flujo, se detectó un solo clon en un 67.6% (54 ganglios), 2 clones en un 22.5% (18 ganglios), 3 clones en el 6.2% (5 ganglios) y 4 clones en el 3.7% (3 ganglios) (Tabla 19).

Tabla 19.- Número y tipo de clones detectados en el ganglio centinela.

Clones tumorales detectados en el GC	Nº de casos (%)
D (sólo clon diploide)	42/80 (52.6%)
A (sólo clon aneuploide)	12/80 (15%)
D + A (clon diploide + clon aneuploide)	17/80 (21.3%)
2A (2 clones aneuploides)	1/80 (1.2%)
D + 2A (clon diploide + 2 clones aneuploides)	4/80 (5%)
3 A (3 clones aneuploides)	1/80 (1.2%)
D + 3A (clon diploide + 2 clones aneuploides)	2/80 (2.5%)
4 A (4 clones aneuploides)	1/80 (1.2%)

4.3.1.5 Número y porcentaje de células CK 18 en el ganglio centinela

En el total de los ganglios analizados por citometría de flujo, el número de células CK18+ detectadas osciló entre ninguna y más de 2525, y el porcentaje entre menos de 0,0001% (en el límite de sensibilidad de la técnica, calculado mediante experimentos de dilución realizados con idéntica metodología, datos no mostrados) y 43%, en el caso de máxima infiltración. El número de células analizadas osciló entre las 50000 y más de 10 millones (media 745000).

4.3.2 COMPARACIÓN DE LOS PATRONES DE EXPRESIÓN DE CK18 Y PLOIDÍA DE ADN ENTRE EL TUMOR PRIMARIO Y EL GANGLIO CENTINELA

Como ya se ha comentado, en los tumores primarios se detectó una elevada heterogeneidad tumoral en base a la expresión de CK18 y especialmente en función de la ploidía de ADN (Tabla 14).

En más de la mitad de los casos (n=64, 51.2%) se detectó coexistencia de varios clones de células tumorales, lo que implica una elevada heterogeneidad tumoral, como se pudo ver en la Tabla 14. Lo más frecuente ha sido la coexistencia de un clon tumoral diploide con 1, 2 3 e incluso 4 clones con diferentes aneuploidías de ADN (n=114, 91%) (Tabla 14).

Por otro lado, de los 125 casos estudiados, 80 mostraron infiltración de al menos una muestra de ganglio centinela por CMF. En la mayoría de los casos (n=53; 67%), las células tumorales encontradas en el ganglio centinela mostraron patrones de contenido celular de ADN (diploide/aneuploide) similares a las del tumor primario (Tabla 19, Tabla 20, Figura 16).

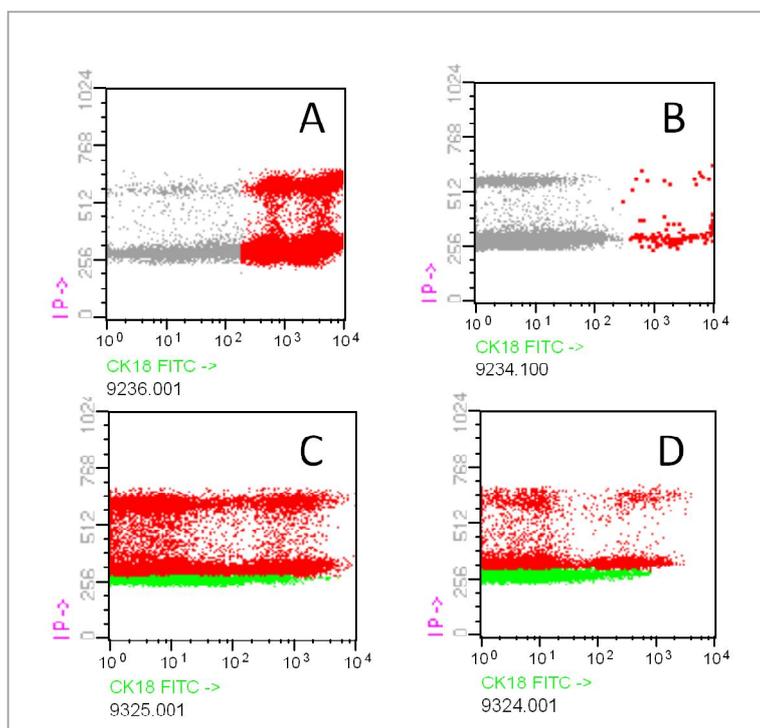


Figura 16.- Estudio comparativo entre TP (A y C) y GC (B y D) de un tumor diploide (A y B) y otro aneuploide (C y D), donde se puede ver con claridad la coincidencia de patrones de CK18 y ploidía entre el TP y el GC.

Tabla 20.- Comparación del patrón de ploidía del ADN entre el tumor primario (TP) y los ganglios centinela (GC) en los casos con infiltración ganglionar tumoral estimada mediante citometría de flujo.

PATRÓN DE PLOIDÍA DEL ADN TP/GC	Nº DE CASOS/TOTAL DE CASOS (%)
Idéntico	53/80 (67%)
Pérdida de una población celular aneuploide	17/80 (21%)
Ganancia de una población celular aneuploide	4/80 (5%)
Pérdida de una población celular diploide	5/80 (6%)
Pérdida y ganancia de diferentes poblaciones celulares tumorales	1/80 (1%)

En los 27 casos restantes (33%) se observaron cambios entre el tumor primario y el ganglio centinela correspondiente, que se asociaron con la ausencia en el ganglio centinela de uno o más de los clones detectados en el tumor primario (n=23; 28%) y, con menos frecuencia, con la observación de una nueva población en muestras de ganglio centinela (n=5; 6%) asociada (n=1; 1%) o no (n=4; 5%) con la ausencia de uno de los las poblaciones de células tumorales detectadas en tumor primario. Es de destacar que, en la mayoría de estos casos, los clones perdidos correspondían a células tumorales con ADN aneuploide (n=17; 21%), mientras que la desaparición de un clon diploide (n= 5; 6%) o de poblaciones celulares con ADN tanto diploide como aneuploide (n=1; 1%), se observó con menos frecuencia. Curiosamente, en un pequeño número de casos (n=4; 5%) se identificó una población de células tumorales de ADN aneuploide/CK18+ que no pudo ser detectada en los tumores primarios en las muestras pareadas de ganglio centinela (Tabla 20, Figura 17).

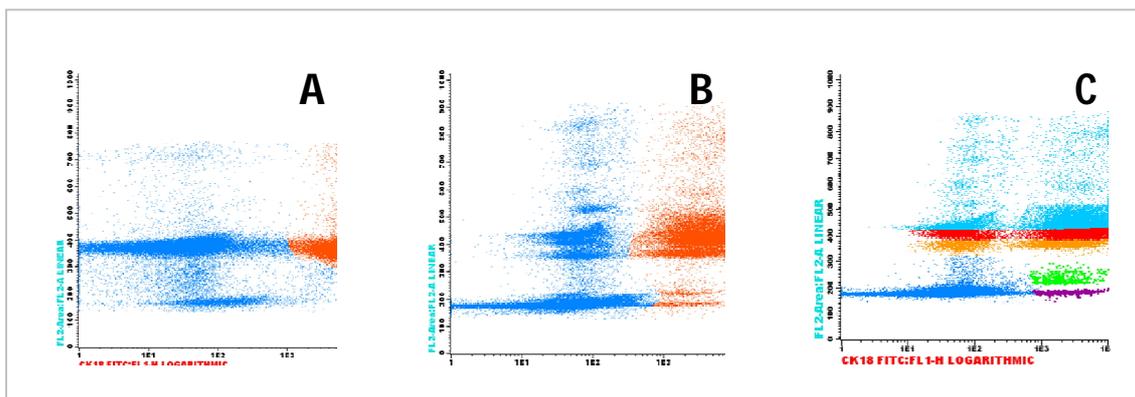


Figura 17.- Comparación entre TP (diagrama A) y GC (diagramas B y C) donde se puede ver cómo en el GC aparecen clones tumorales nuevos que no se habían detectado en el TP. En el diagrama C los clones se han marcado con diferentes colores para facilitar su identificación.

En cuanto a la expresión de CK18, se encontraron patrones idénticos para cada clon de células tumorales entre el ganglio centinela y la población correspondiente en el tumor primario en la mayoría de los casos (54/80; 67%) (Tabla 21, Figura 18). Dentro de aquellos en que hemos detectado diferencias, señalar que sólo en un caso (1%) se observó una menor reactividad de CK18 en el ganglio centinela respecto al tumor primario, mientras que en los restantes 26 casos (32%) se encontró una mayor reactividad de CK18 en las células tumorales del GC que de las células tumorales del tumor primario.

Tabla 21.- Comparación del patrón de expresión de CK18 entre el tumor primario (TP) y los ganglios centinela (GC) en los casos con infiltración ganglionar tumoral estimada mediante citometría de flujo.

PATRÓN DE EXPRESIÓN DE CK18 TP/GC	Nº DE CASOS/TOTAL DE CASOS (%)
Idéntico	54/80 (67%)
Disminución en el GC respecto al TP	1/80 (1%)
Aumento en el GC respecto al TP	26/80 (32%)

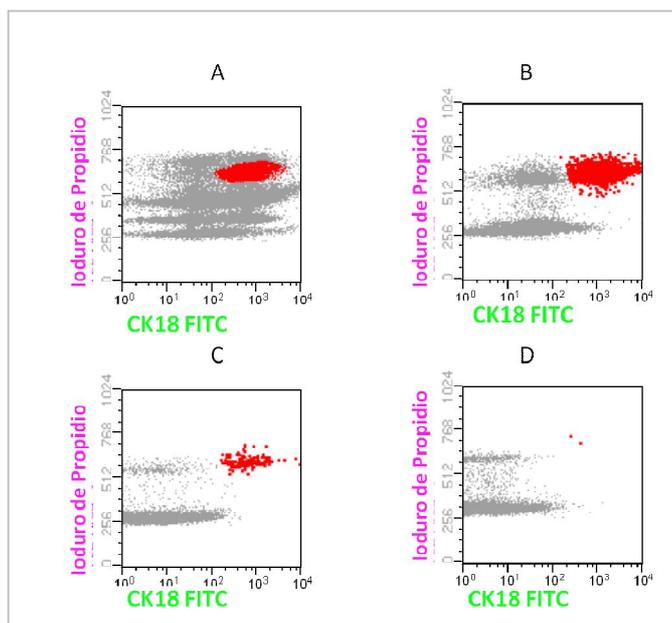


Figura 18.- Análisis correlativo de muestras en una misma paciente. En ellos se observa que sólo uno de los clones presente en el TP (A) está presente también en los GC (B, C y D), disminuyendo la infiltración del primer (B) al segundo (C) y al tercer (D) GC estudiados.

4.4 ESTUDIO DE LA CMFm COMO PRUEBA DIAGNÓSTICA PARA LA DETECCIÓN DE INFILTRACIÓN TUMORAL EN EL GANGLIO CENTINELA. COMPARACIÓN CON LA TÉCNICA INMUNOHISTOQUÍMICA CONVENCIONAL.

4.4.1 COMPARACIÓN DE LA TÉCNICA DE CMFM CON LA TÉCNICA INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)

Se compararon los resultados obtenidos respecto a afectación metastásica a nivel del ganglio centinela tanto por Citometría de flujo (CMF) como por anatomía patológica (IHQ). Estos resultados fueron concordantes en 105 casos (84%). En 65 casos (51%), ambas pruebas fueron positivas y en 40 casos (33%) ambas fueron negativas. Hubo discordancia en 20 casos (16%); en 5 casos (4%) la CMF resultó negativa, mientras que la IHQ fue positiva, mientras que en otros 15 casos (12%) la CMF fue positiva, siendo negativa la IHQ (Tabla 22).

4.4.1.1 Estudio de la sensibilidad, especificidad, VPP, VPN

Se realizó una tabla de contingencia (Tabla 22), comparando los resultados de ambas pruebas para la detección de enfermedad mínima residual (metástasis y micrometástasis) a nivel del ganglio centinela. Dado que la CMFm fue la prueba a

comparar, utilizamos el estudio anatomopatológico mediante inmunohistoquímica (IHQ) como prueba *gold standard* para el diagnóstico de enfermedad mínima residual ganglionar.

Tabla 22.- Tabla de contingencia relacionando el resultado de la infiltración ganglionar obtenido mediante IHQ y CMF.

		ESTADO GANGLIONAR ANATOMOPATOLÓGICO		
		N1	NO	TOTAL
RESULTADO INFILTRACIÓN GC POR CMF	SI	65 (VP)*	15 (FP)**	80
	NO	5*** (FN)	40 (VN)	45
TOTAL		70	55	125

*4 casos con micrometástasis.
 ** En 2 de ellos se detectaron células tumorales aisladas
 ***3 casos con micrometástasis.

Con estos datos se calculó la sensibilidad, especificidad, el valor predictivo positivo y valor predictivo negativo, como parte del estudio de validez de una prueba diagnóstica (248, 249) (Tabla 23).

La sensibilidad de la CMFm obtenida en este estudio ha sido elevada (93%), siendo la especificidad del 73% y los valores predictivos positivo y negativo del 81% y 89%, respectivamente (Tabla 23).

Tabla 23.- Cálculo de la Sensibilidad, Especificidad, Valor Predictivo Positivo y Valor Predictivo Negativo

S=VP/VP+FN	S=65/65+5	S=93%
E=VN/VN+FP	E=40/40+15	E=73%
VPP=VP/VP+FP	VPP=65/65+15	VPP=81%
VPN=VN/VN+FN	VPN=40/40+5	VPN=89%

Dado que la combinación de marcaje con CK18 y cuantificación de ADN por citometría de flujo, que hemos nombrado como CMFm se asume, en base a sus resultados en otras áreas y/o aproximaciones preliminares, como una técnica de entrada más sensible y específica que el estudio anatomopatológico mediante inmunohistoquímica, nos propusimos: 1) revisar los casos discordantes buscando una posible explicación para la discordancia y 2) utilizar la evolución clínica de de las pacientes como *gold standard*, dado el elevado tiempo de seguimiento de nuestro estudio.

4.4.1.2 Análisis de los casos discordantes

En la Tabla 24 se muestran los casos discordantes entre la citometría de flujo y la IHQ. Se puede ver el patrón de ploidía y de expresión de CK18 del tumor primario y el número de células adquiridas, número de células CK18 positivas, el porcentaje de células CK18 detectadas (y su plodía) en el ganglio centinela, así como la aparición de eventos clínicos adversos: recaída local (RL) y metástasis a distancia (MTS).

Aunque en la Discusión se analizará esta tabla detalladamente, es importante comentar los 5 casos donde se detectó infiltración mediante IHQ y no mediante CMFm. En 3 de ellos se detectaron micrometástasis, no se trata de casos CK18- ni todos son diploides, por lo que -teóricamente al menos- la CMFm tendría que haber detectado infiltración si la hubiera, dado que a priori es una técnica mucho más sensible. La única explicación posible sería que la muestra analizada mediante CMF y IHQ no fuera equiparable; es decir, que perteneciera a lugares diferentes del mismo ganglio centinela y que, teniendo en cuenta que la implantación metastásica ganglionar no es uniforme, se hubiera recibido una zona infiltrada en un laboratorio (IHQ en este caso) y otra no infiltrada en otro (CMFm).

La explicación para los casos CMFm+/IHQ- sería, al menos parcialmente y desde el punto de vista teórico, atribuible a la mayor sensibilidad de la CMFm.

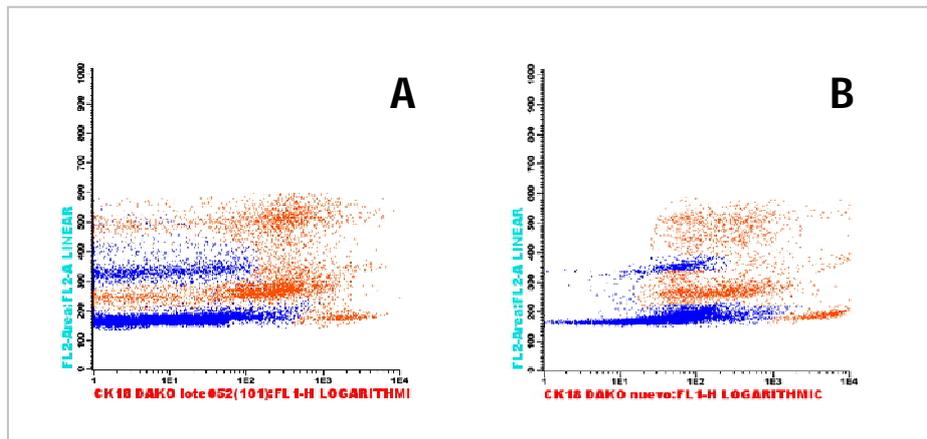


Figura 19.- Imágenes correspondientes al caso número 113. En la figura A se muestra el patrón de CK18/ploidía del tumor primario y en la B el patrón correspondiente al ganglio centinela. El alto % de células tumorales (16%) y la coincidencia entre patrón CK18/ploidía entre TP y GC prácticamente obliga a interpretarlo como un falso negativo de la IHQ convencional.

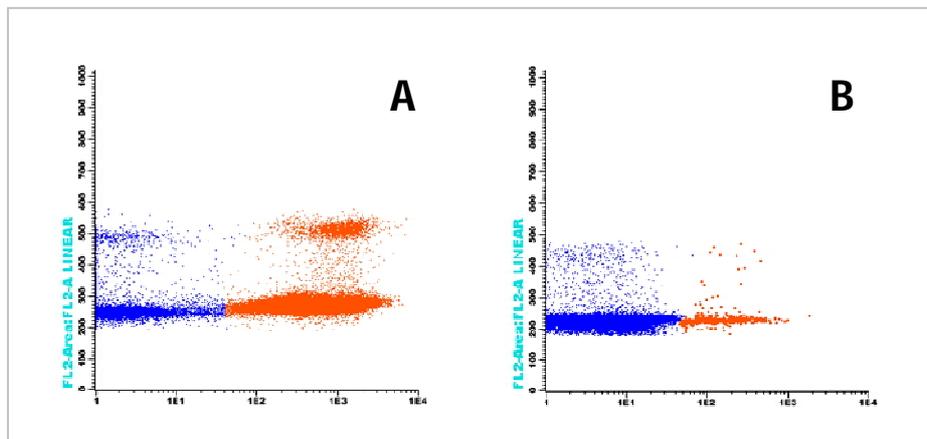


Figura 20.- Imágenes correspondientes al caso número 47. La detección de 314 eventos CK18+ diploides en el GC (0.37%, del total de células estudiadas) nos permite afirmar que se trata de células tumorales infiltrantes en el GC, por lo que podemos interpretar este caso como un falso negativo de la IHQ convencional, al menos en principio.

Tabla 24.- Patrones de expresión de CK18 y ploidía en tumor primario y ganglios centinela detectados por citometría de flujo en los casos discordantes entre la citometría de flujo y el estudio anatomopatológico mediante inmunohistoquímica.

TUMOR PRIMARIO					GANGLIO CENTINELA			
Caso	MTS	RL	Ploidía	% células CK18+	Ploidía	Nº células CK18+	Nº células adquiridas	% células CK18+
Casos NO/CMF+								
43	NO	NO	D	100%	D	40	441105	0.009%
47	NO	NO	D	100%	D	314	83580	0.37%
66	SI	NO	DAA	100%	DAA	51	112545	0.045%
67	NO	NO	DAA	100%	D	50	370335	0.01%
70	NO	NO	D	100%	D	13	382095	0.003%
75	NO	NO	DAA	100%	D	78	594480	0.013%
77	NO	NO	DA	50%	D	1153	484170	0.24%
84	NO	NO	D	30%	D	66	50000	0.13%
113	SI	NO	DAA	33%	DAA	>1000	235530	16%
133	NO	NO	DA	100%	DA	11	90300	0.012%
181	SI	NO	D	90%	D	21	27000	0.0078%
185	NO	NO	D	75%	D	48	145230	0.033%
186	NO	NO	D	80%	D	13	276765	0.0047%
191	NO	NO	D	75%	D	13	340000	0,038%
202	NO	NO	DAAA	98%	D	20	350000	0.0057%
Casos N1/CMF-								
99**	NO	NO	DA	95%	D	1	468735	<0.00021%
169	NO	NO	D	100%	D	1	405060	<0.00025%
182	NO	NO	D	75%	D	1	55050	<0.0018%
190**	NO	NO	D	97%	D	3	103935	<0.0029%
192**	NO	NO	DA	35%	D	1	90000	<0.0011%

D: Diploide; A: Aneuploide; DA: Caso con células tumorales diploides y aneuploides. *Células tumorales CK18+ detectadas en el ganglio centinela. * Casos NO con presencia de células tumorales aisladas por IHQ ** Casos N1 con micrometástasis por IHQ.

4.4.1.3 Valor diagnóstico de la CMFm para la detección de infiltración ganglionar, utilizando como gold standard la evolución clínica

Otra forma de evaluar la capacidad de detección de la infiltración ganglionar de la técnica de CMFm usada en este estudio frente a la IHQ es el análisis de la comparación de ambas técnicas en términos de evolución clínica. En este sentido, hemos utilizado tres parámetros: 1) la aparición de un evento adverso (metástasis local, metástasis a distancia

y exitus) relacionado con el carcinoma de mama; 2) la supervivencia libre de enfermedad (SLE); y 3) la supervivencia global (SG).

4.4.1.3.1 Valoración de la infiltración ganglionar estimada mediante IHQ y CMFm en función de la aparición de evento adverso (recaída local, metástasis a distancia y exitus)

Se valoró conjuntamente la positividad de la prueba en función de la aparición de evento adverso atribuible al cáncer de mama en el total de las pacientes. Así, se seleccionaron las pacientes con presencia o no de dicho evento adverso y se analizaron los casos en los que tanto la CMF como la IHQ fueron positivas tanto en las pacientes que lo sufrieron como en las que no (Figura 21, Tabla 25). Como evento adverso se consideraron la recidiva local, las metástasis a distancia y el exitus. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de ellos.

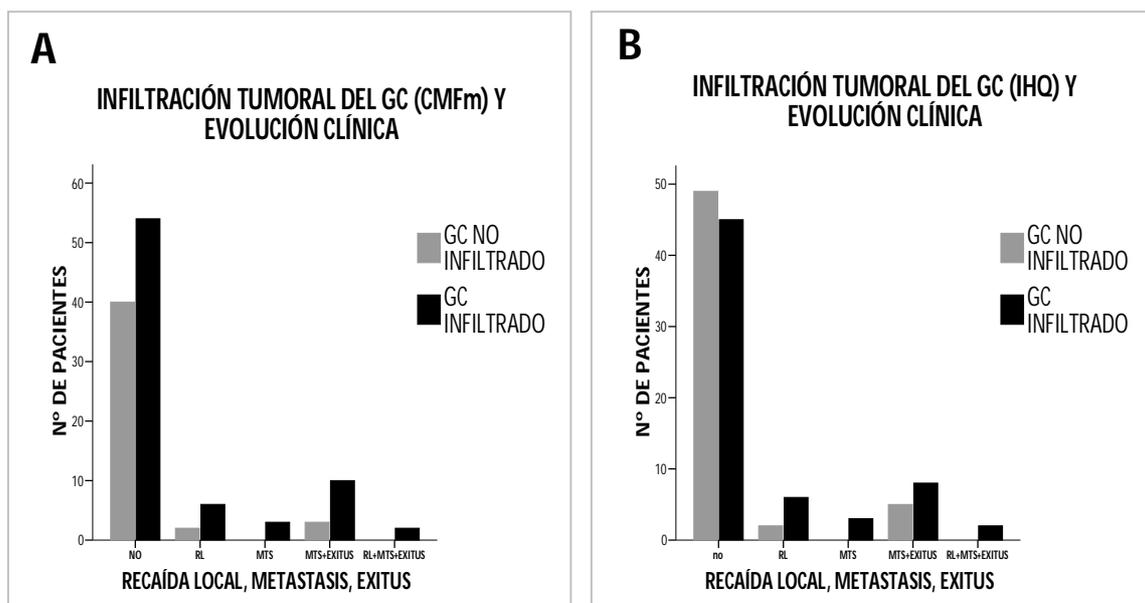


Figura 21.- Representación gráfica de la infiltración tumoral del ganglio centinela estimada mediante CMF (A) e IHQ (B), agrupada en función de la evolución clínica de las pacientes.

La CMF fue positiva en las mismas ocasiones que la IHQ cuando se consideró el global de eventos adversos (RL+MTS+Exitus, 2 eventos), la recaída local aislada (RL, 6 eventos) o las metástasis aisladas (MTS, 3 eventos). Sin embargo, la CMFm fue positiva en más ocasiones que la IHQ cuando se analizó la presencia de metástasis y exitus (MTS+EXITUS, 10 eventos frente a 8), aunque estas diferencias no llegaron a alcanzar significación estadística (Figura 21, Tabla 25).

Tabla 25.- Relación de la infiltración ganglionar estimada por Citometría de Flujo Multiparamétrica (CMFm) e Inmunohistoquímica (IHQ) y su relación con la aparición de evento adverso: Recaída local (RL), Metástasis (MTS), Metástasis y exitus (MTS+EXITUS), Recaída local, metástasis y exitus (RL+MTS+EXITUS). Datos expresados en número de pacientes.

	INFILTRACIÓN GANGLIONAR ESTIMADA POR:			
	CMFm		IHQ	
	SI	NO	SI	NO
SIN EVENTO	54	40	45	49
RL	6	2	6	2
MTS	3	0	3	0
MTS+EXITUS	10	3	8	5
RL+MTS+EXITUS	2	0	2	0
TOTAL	75	45	64	56

Por otro lado, si bien la positividad tanto de la CMF como de la IHQ fue muy similar en pacientes con evento adverso, la CMF se mostró positiva también en más ocasiones que la IHQ en pacientes que no presentaron dicha complicación (54 frente a 45 eventos, Figura 21, Tabla 25). En este sentido, es posible que la alta sensibilidad de la CMFm para detectar carga tumoral mínima pueda incrementar el porcentaje de positividad de esta prueba respecto a la IHQ sin que se acompañe de repercusión clínica posterior.

4.4.1.4 **Comparación de los resultados de infiltración ganglionar estudiados mediante IHQ y CMFm con la SG y la SLE**

La SLE fue menor en las pacientes con infiltración tumoral del ganglio centinela, demostrándose diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos tanto si la infiltración ganglionar fue estimada por CMF ($p=0.028$) como por IHQ ($p=0.022$) (Figura 22).

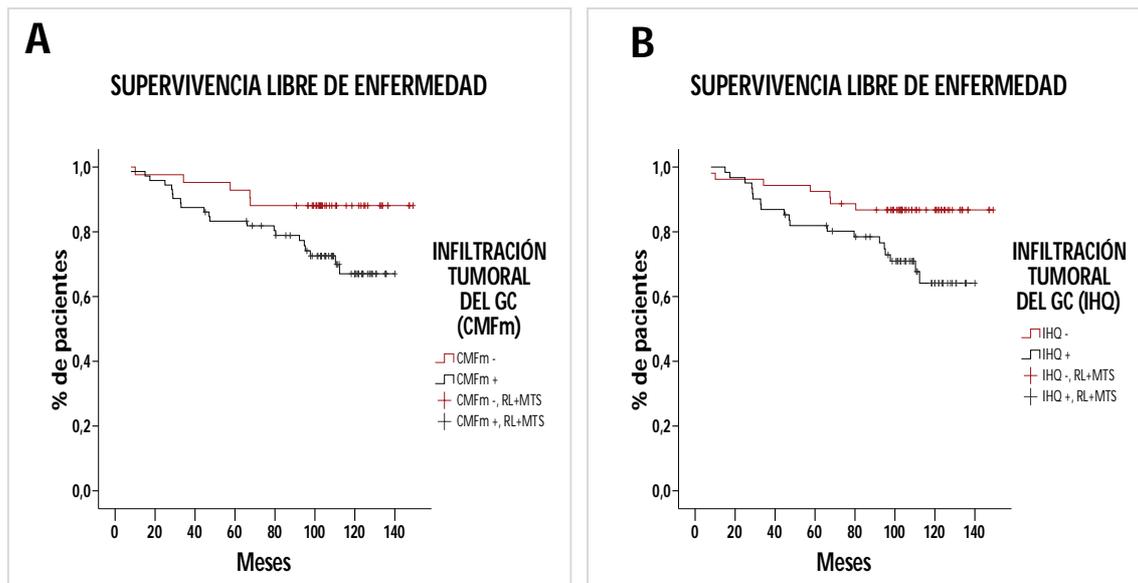


Figura 22.- Representación gráfica de la Supervivencia Libre de Enfermedad en función de la infiltración tumoral del ganglio centinela valorada mediante CMF (A) e IHQ (B).

Respecto a la SG, también pudo observarse una disminución en la misma en las pacientes con infiltración tumoral demostrada tanto por CMF como por IHQ, aunque en este caso en ninguna de las dos técnicas pudo demostrarse significación estadística (Figura 23).

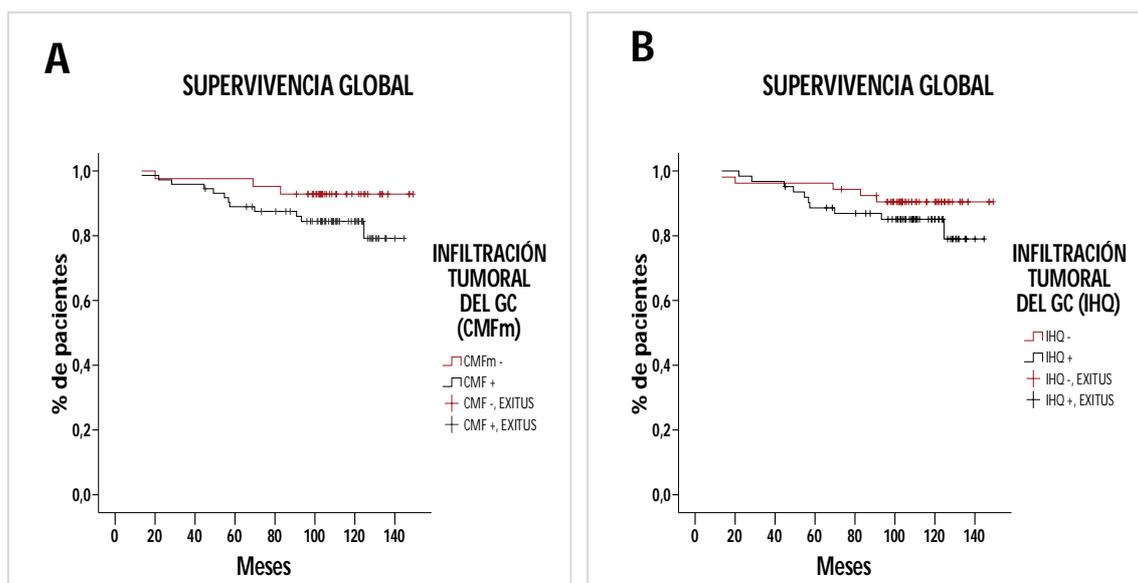


Figura 23.- Representación gráfica de la Supervivencia Global en función de la infiltración tumoral del ganglio centinela valorada mediante CMF (A) e IHQ (B).

4.5 ESTUDIO DE LA CORRESPONDENCIA ENTRE LAS CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DEL TUMOR Y LA AFECTACIÓN METASTÁSICA EN EL GANGLIO CENTINELA VALORADA MEDIANTE IHQ Y CMFm

4.5.1.1 *Análisis univariante*

Para tratar de identificar qué características tumorales podrían estar asociadas a un mayor poder metastásico, se realizó análisis univariante de cada una de ellas respecto a la infiltración tumoral del ganglio centinela por IHQ en un primer paso y por CMFm posteriormente.

Se analizaron 11 variables: edad, tamaño tumoral, tipo histológico, grado histológico, positividad para RE, RP, p53 y Her2-neu, ploidía, fracción de fase S (FFS) y porcentaje de captación de CK18 en las células del tumor primario (Tabla 29). Durante esta primera fase, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las siguientes variables: tamaño tumoral, tipo histológico y ploidía (Tabla 26).

Tabla 26.- Características tumorales con asociación estadísticamente significativa en el análisis univariante con la infiltración metastásica del ganglio centinela valorada mediante IHQ.

VARIABLES ASOCIADAS A LA INFILTRACIÓN DEL GC VALORADA POR IHQ (ANÁLISIS UNIVARIANTE)			
Variable	Nº de pacientes	Pacientes con GC + (%)	Significación (p)
TAMAÑO TUMORAL			
T1	52	20 (29.9%)	0.002
T2	70	47 (70.1%)	
TIPO HISTOLÓGICO			
CDI	101	60 (87.0%)	0.002
CLI	12	9 (13.0%)	
CDI+CLI	1	0 (0.0%)	
CDIS	4	0 (0.0%)	
OTROS	7	0 (0.0%)	
PLOIDÍA			
DIPLOIDE	57	23 (33.3%)	0.002
ANEUPLOIDE	68	46 (66.7%)	

Al realizar el mismo análisis con los datos de infiltración ganglionar mediante CMFm, los resultados del análisis fueron concordantes, es decir, la citometría de flujo encontró diferencias estadísticamente significativas en las mismas variables que la anatomía patológica (Tabla 27).

Tabla 27.- Características tumorales con asociación estadísticamente significativa en el análisis univariante con la infiltración metastásica del ganglio centinela valorada mediante CMFm.

VARIABLES ASOCIADAS A LA INFILTRACIÓN DEL GC VALORADA POR CMFm (ANÁLISIS UNIVARIANTE)			
Variable	Nº de pacientes	Pacientes con GC + (%)	Significación (p)
TAMAÑO TUMORAL			
T1	52	23 (29.5%)	<0.001
T2	70	55 (70.5%)	
TIPO HISTOLÓGICO			
CDI	101	66 (82.5%)	0.015
CLI	12	11 (13.8%)	
CDI+CLI	1	0 (0.0%)	
CDIS	4	1 (1.2%)	
OTROS	7	2 (2.5%)	
PLOIDÍA			
DIPLOIDE	57	30 (37.5%)	0.015
ANEUPLOIDE	68	50 (62.5%)	

4.5.1.2 *Análisis multivariante*

En un segundo paso, se realizó el análisis multivariante mediante regresión logística, incluyendo aquellos parámetros que se habían asociado a la infiltración tumoral del ganglio centinela con diferencias estadísticamente significativas en el análisis univariante: ploidía, tipo histológico y tamaño tumoral. Se encontró asociación estadísticamente significativa entre dos variables (ploidía y tamaño tumoral) y la afectación metastásica tumoral del ganglio centinela, tanto por IHQ como por CMF (Tabla 28).

En el caso de la ploidía, el exponencial B fue de 2.7, lo que implica que en la población de nuestro estudio el riesgo de afectación metastásica del ganglio centinela es 2.7 veces mayor en tumores aneuploides que en los diploides. Para el tamaño tumoral, el exponencial B fue de 2.8 es decir, en las pacientes de este estudio, el riesgo de afectación metastásica del ganglio centinela es 2.8 veces mayor en tumores T2 que en los T1 (Tabla 28).

Tabla 28.- Variables con asociación estadísticamente significativa a la infiltración tumoral del ganglio centinela en el análisis multivariante.

VARIABLES ASOCIADAS A LA INFILTRACIÓN DEL GC (ANÁLISIS MULTIVARIANTE)		
	SIGNIFICACION (p)	EXP (B)
PLOIDIA	0.007	2.7
TAMAÑO TUMORAL	0.028	2.8

Por tanto, las variables ploidía y tamaño tumoral demostraron comportarse como **factores de riesgo independientes** para la afectación metastásica del ganglio centinela.

Tabla 29.- Parámetros relacionados estadísticamente con la infiltración metastásica en ganglio centinela, valorada mediante IHQ y CMFm, en el análisis univariante.

VARIABLE	N	INFILTRACIÓN GANGLIONAR POR IHQ		INFILTRACIÓN GANGLIONAR POR CMF	
		Nº de pacientes (%)	VALOR p	Nº de pacientes (%)	VALOR p
EDAD					
<40	16	10 (14.7%)	NS	11 (13.6%)	NS
40-49	23	13 (19.1%)		15 (18.5%)	
50-59	30	17 (25.0%)		18 (22.2)	
60-69	23	10 (14.7%)		13 (16.0%)	
≥70	33	18 (26.5%)		24 (29.6%)	
TAMAÑO TUMORAL					
T1	52	20 (29.9%)	0.002	23 (29.5%)	<0.001
T2	70	47 (70.1%)		55 (70.5%)	
TIPO HISTOLÓGICO					
CDI	101	60 (87.0%)	0.002	66 (82.5%)	0.015
CLI	12	9 (13.0%)		11 (13.8%)	
CDI+CLI	1	0 (0.0%)		0 (0.0%)	
CDIS	4	0 (0.0%)		1 (1.2%)	
OTROS	7	0 (0.0%)		2 (2.5%)	
GRADO HISTOLÓGICO					
I	16	5 (8.3%)	NS	8 (11.6%)	NS
II	47	31 (51.7%)		35 (50.7%)	
III	44	24 (40.0%)		26 (37.7%)	
RE					
+	94	55 (83.3%)	NS	65 (83.3%)	NS
-	25	11 (16.7%)		13 (16.7%)	
RP					
+	89	53 (79.1%)	NS	60 (76.9%)	NS
-	31	14 (20.9%)		18 (23.1%)	
p53					
+	37	24 (41.4%)	NS	23 (33.8%)	NS
-	66	34 (58.6%)		45 (66.2%)	
Her2-neu					
+	16	8 (12.5%)	NS	9 (12.5%)	NS
-	92	56 (87.5%)		63 (87.5%)	
PLOIDÍA					
DIPLOIDE	57	23 (33.3%)	0.002	30 (37.5%)	0.015
ANEUPLOIDE	68	46 (66.7%)		50 (62.5%)	
FFS (TERCILES)					
BAJA	40	17 (42.5%)	NS	25 (62.5%)	NS
MEDIA	40	24 (60.0%)		27 (62.7%)	
ALTA	41	25 (61.0%)		27 (65.9%)	
PORCENTAJE DE CK 18 EN TUMOR PRIMARIO (MEDIANA)					
≤93%	3	1 (1.5%)	NS	1 (1.2%)	NS
>93%	122	67 (98%)		80 (98.8%)	

4.6 VALOR PRONÓSTICO DE LA PLOIDÍA DE ADN Y DEL CICLO CELULAR (FFS) ESTIMADOS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO MULTIPARAMÉTRICA (CMFm)

4.6.1 CORRELACIÓN DE LAS VARIABLES DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO (PLOIDÍA Y FRACCIÓN DE LA FASE S) CON LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DEL TUMOR PRIMARIO

Otro de los objetivos de este trabajo ha sido evaluar el poder pronóstico de los parámetros vinculados a la cantidad de ADN medida por citometría en las células tumorales: ploidía y tasa de proliferación celular (FFS).

Para ello, como un primer acercamiento, evaluamos dichas variables en comparación a parámetros clínico-patológicos pronósticos clásicos en las pacientes de nuestro estudio.

Como se ha expuesto anteriormente, la **edad** de las pacientes se estratificó, de cara a facilitar el análisis estadístico, en 5 grupos. No se encontró asociación estadísticamente significativa entre la edad y la ploidía ($p=0.897$) ni entre la edad y la FFS ($p=0.325$) (Tabla 30).

Tampoco se encontró asociación estadísticamente significativa al comparar el **tipo histológico** con la ploidía ($p=0.533$) ni con la FFS ($p=0.195$) (Tabla 30).

Por el contrario, sí se encontró asociación estadísticamente significativa entre el **grado histológico** (I, II, III) y tanto la ploidía ($p=0.001$) como la FFS ($p<0.001$). El grado histológico bajo se relacionó con tumores diploides por citometría de flujo y con porcentajes de FFS menores que los tumores con alto grado histológico (II y III), asociados a aneuploidía y a porcentajes mayores de FFS (Tabla 30).

Con respecto al **tamaño tumoral**, la ploidía se asoció, de forma estadísticamente significativa, con un mayor tamaño tumoral ($p=0.013$), mientras que la FFS no se relacionó con dicho factor ($p=0.467$) (Tabla 30).

De la misma manera, la ploidía sí mostró una asociación estadísticamente significativa con la **afectación metastásica del ganglio centinela** ($p=0.001$) en el sentido de mayor incidencia de infiltración del GC entre los casos aneuploides, pero no la FFS ($p=0.173$) (Tabla 30).

Tanto la expresión de **receptores estrogénicos (RE)** como la de la **proteína p53** se asociaron significativamente con la ploidía ($p=0.018$ y $p=0.024$, respectivamente) y con la FFS ($p<0.001$ y $p=0.002$) en el sentido de que la positividad de RE y la p53 se relacionaron con los casos diploides y con menor proliferación (Tabla 30). Tan solo la FFS se relacionó de forma estadísticamente significativa con la presencia de **receptores de progesterona (RP)** ($p=0.006$) y la expresión del **Her2-neu** ($p=0.016$). La positividad de RP se relacionó con una menor FFS mientras que la positividad de *Her2-neu* lo hizo con una mayor FFS (Tabla 30).

En lo referente a la evolución clínica de las pacientes de nuestro estudio, ni la ploidía ($p=0.659$) ni la FFS ($p=0.330$) mostraron asociación estadísticamente significativa con la aparición de **recidiva local**. Sin embargo, la ploidía sí demostró una asociación estadísticamente significativa con la aparición de **metástasis a distancia** ($p=0.015$), aunque la FFS no consiguió demostrar tal asociación ($p=0.453$) (Tabla 30).

Tabla 30.- Relación de las características clínico-patológicas del tumor con las variables asociadas al ciclo celular estudiadas mediante CMF (Ploidía y FFS).

Características	n	PLOIDÍA		p valor	n	FFS (Terciles)			p valor
		Nº de pacientes (%)				Nº de pacientes (%)			
		Diploide	Aneuploide			FFS Baja	FFS Media	FFS Alta	
EDAD									
<40	16	8 (14.0%)	8 (11.8%)	NS	15	3 (7.5%)	5 (12.5%)	7 (17.1%)	NS
40-49	23	12 (21.1%)	11 (16.2%)		23	5 (12.5%)	8 (20.0%)	10 (24.4%)	
50-59	30	12 (21.1%)	18 (26.5%)		29	13 (32.5%)	11 (27.5%)	5 (12.2%)	
60-69	23	11 (19.3%)	12 (17.6%)		21	5 (12.5%)	7 (17.5%)	9 (22.0%)	
≥70	33	14 (24.6%)	19 (27.9%)		33	14 (35.0%)	9 (22.5%)	10 (24.4%)	
TIPO HISTOLÓGICO									
CDI	101	43 (75.4%)	58 (85.3%)	NS	97	27 (67.5%)	36 (90.0%)	34 (82.9%)	NS
CLI	12	6 (10.5%)	6 (8.8%)		12	7 (17.5%)	3 (7.5%)	2 (4.9%)	
CDI+CLI	1	1 (1.8%)	0 (0%)		1	1 (2.5%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	
CDIS	5	3 (5.3%)	2 (2.9%)		5	1 (2.5%)	1 (2.5%)	2 (4.9%)	
OTROS	6	4 (7.0%)	2 (2.9%)		6	4 (10.0%)	0 (0.0%)	3 (7.3%)	
GRADO									
I	16	12 (25.5%)	4 (6.7%)	0.001	15	9 (32.1%)	5 (13.2%)	1 (2.7%)	<0.001
II	47	24 (51.1%)	23 (38.3%)		44	15 (53.6%)	19 (50.0%)	10 (27.0%)	
III	44	11 (23.4%)	33 (55.0%)		44	4 (14.3%)	14 (36.8%)	26 (70.3%)	
TAMAÑO TUMORAL									
T1	53	31 (54.4%)	22 (32.4%)	0.013	50	20 (50.0%)	14 (36.8%)	16 (40.0%)	NS
T2	72	26 (45.6%)	46 (67.6%)		68	20 (50.0%)	24 (63.2%)	24 (60.0%)	
ESTADO GANGLIONAR (IHQ)									
N0	57	35 (61.4%)	22 (32.4%)	0.001	55	23 (57.5%)	16 (40.0%)	16 (39.0%)	NS
N1	68	22 (38.6%)	46 (67.6%)		66	17 (42.5%)	24 (60.0%)	25 (61.0%)	
RE									
+	95	47 (88.7%)	48 (71.6%)	0.018	90	36 (97.3%)	32 (84.2%)	22 (55.0%)	<0.001
-	25	6 (11.3%)	19 (28.4)		25	1 (2.7%)	6 (15.8%)	18 (45.0%)	
RP									
+	90	43 (79.6%)	47 (70.1%)	NS	87	33 (86.8%)	31 (81.6%)	23 (57.5%)	0.006
-	31	11 (20.4%)	20 (29.9%)		29	5 (13.2%)	7 (18.4%)	17 (42.5%)	
P53									
+	38	12 (25.0%)	26 (46.4%)	0.024	36	5 (15.6%)	12 (34.3%)	19 (57.6%)	0.002
-	66	36 (75.0%)	30 (53.6%)		64	27 (84.4%)	23 (65.7%)	14 (42.4%)	
HER2-NEU									
+	16	4 (8.0%)	12 (18.2%)	NS	16	1 (2.9%)	5 (14.7%)	10 (27.8%)	0.016
-	100	46 (92.0%)	54 (81.8%)		88	33 (97%)	29 (85.3%)	26 (72.2%)	
RECIDIVA LOCAL									
SI	10	4 (7.1%)	6 (9.4%)	NS	9	4 (10.3%)	1 (2.6%)	4 (10.5%)	NS
NO	110	52 (92.9%)	58 (90.6%)		107	35 (89.7%)	38 (97.4%)	34 (89.5%)	
METASTASIS									
SI	19	4 (7.3%)	15 (23.8%)	0.015	18	4 (10.5%)	6 (15.8%)	8 (21.1%)	NS
NO	99	51 (92.7%)	48 (76.2%)		96	34 (89.5%)	32 (84.2%)	30 (78.9%)	

4.6.2 ESTIMACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA GLOBAL (SG) Y LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD (SLE) Y SU ASOCIACIÓN CON LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DEL TUMOR Y LAS VARIABLES ASOCIADAS AL CICLO CELULAR Y ESTIMADAS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO (PLOIDÍA Y FRACCIÓN DE LA FASE S)

Para valorar la influencia en la supervivencia global (SG) y en la supervivencia libre de enfermedad (SLE) de las distintas variables tanto clínico-patológicas como de la citometría de flujo, se hicieron estimaciones de la supervivencia a los 5 y 10 años de seguimiento.

4.6.2.1 ASOCIACIÓN DE LA SG Y SLE CON LAS VARIABLES CLÍNICAS

4.6.2.1.1 Asociación de la SG y SLE con la edad

En nuestro grupo de estudio, la edad no se relacionó con significación estadística con la SG ($p=0.532$) (Tabla 32) ni con la SLE ($p=0.505$) (Tabla 31).

4.6.2.1.2 Asociación de la SG y SLE con el tipo histológico

Tampoco se encontró asociación estadísticamente significativa entre el tipo histológico y la SG ($p=0.895$) (Tabla 32, Figura 24), ni entre éste y la SLE ($p=0.704$) (Tabla 31, Figura 24).

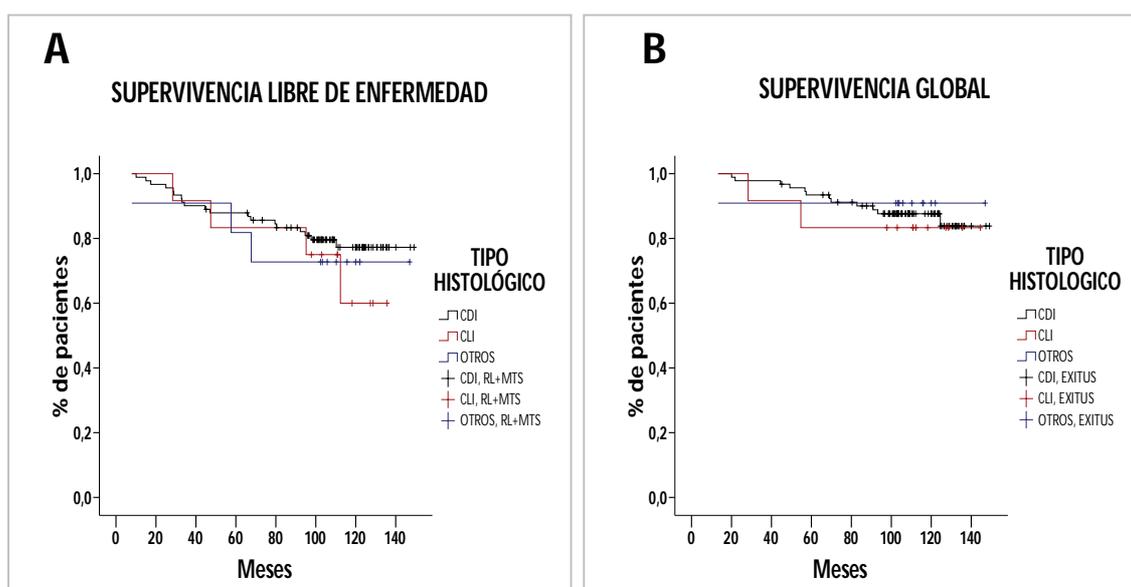


Figura 24.- Representación gráfica mediante las curvas de Kaplan-Meier de la relación entre la Supervivencia Libre de Enfermedad (A) y la Supervivencia Global (B) con el tipo histológico.

4.6.2.1.3 Asociación de la SG y SLE con el grado tumoral

Por el contrario, el grado histológico se relacionó significativamente con la supervivencia libre de enfermedad ($p=0.037$), con una SLE estimada a los 5 y 10 años del 100% para los tumores grado I (bajo grado) y del 86 y 73% para los tumores grado II y III (alto grado) (Tabla 31, Figura 25). Sin embargo, a pesar de que la tendencia en las curvas es clara, no se alcanzó la significación estadística entre esta variable y la supervivencia global ($p=0.123$) (Tabla 32, Figura 25).

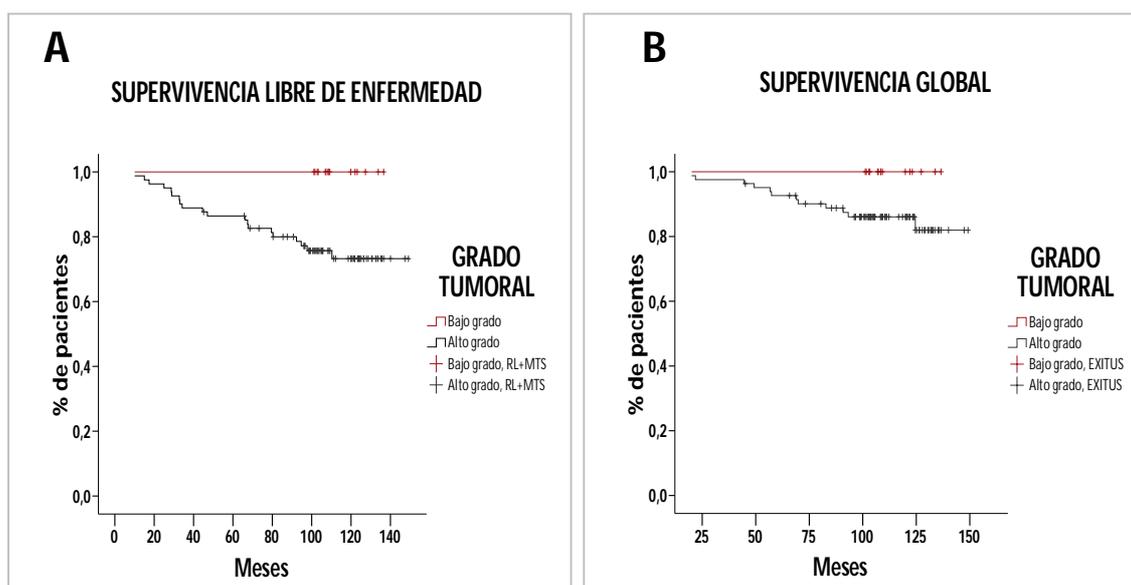


Figura 25.- Representación gráfica mediante las curvas de Kaplan-Meier de la relación entre la Supervivencia Libre de Enfermedad (A) y la Supervivencia Global (B) con el grado tumoral.

4.6.2.1.4 Asociación de la SG y SLE con el tamaño tumoral

También el tamaño tumoral condicionó la supervivencia libre de enfermedad alcanzándose diferencias estadísticamente significativas ($p=0.027$), con una SLE estimada a los 5 y 10 años del 94 y 85% para los tumores menores de 2 cm (T1) y del 80 y 64% para los tumores mayores de 2 y menores de 5 cm (T2) (Tabla 31, Figura 26).

Aunque en las curvas de SLE y SG es clara la mayor tendencia a sufrir evento adverso en los tumores de mayor tamaño, las diferencias no alcanzaron la significación estadística ($p=0.093$) (Tabla 32, Figura 26).

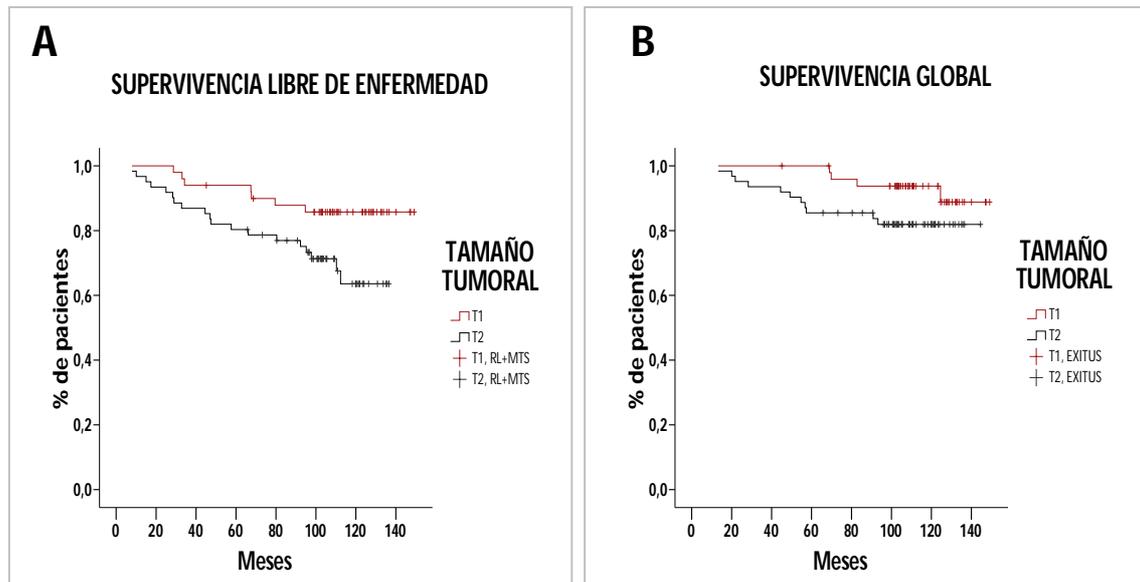


Figura 26.- Representación gráfica mediante las curvas de Kaplan-Meier de la relación entre la Supervivencia Libre de Enfermedad (A) y la Supervivencia Global (B) con el tamaño tumoral.

4.6.2.1.5 Asociación de la SG y SLE con la afectación metastásica del ganglio centinela

La afectación metastásica del ganglio centinela valorada mediante IHQ, se asoció de manera estadísticamente significativa con la supervivencia libre de enfermedad ($p=0.046$), con una SLE estimada a los 5 y 10 años del 93 y 85% para el grupo de pacientes sin afectación ganglionar (N0) y del 82 y 65% para aquellas pacientes en las que el ganglio centinela estuvo afectado (N1) (Tabla 31, Figura 27).

No se encontró asociación estadísticamente significativa entre la afectación metastásica ganglionar estimada mediante IHQ y la supervivencia global ($p=0.267$) (Tabla 32, Figura 27).

Estos resultados fueron similares a los encontrados cuando la afectación metastásica del ganglio centinela se valoró mediante CMF. No se encontró asociación estadísticamente significativa entre la supervivencia global y la afectación metastásica ganglionar detectada mediante CMF ($p=0.123$) (Tabla 32, Figura 28).

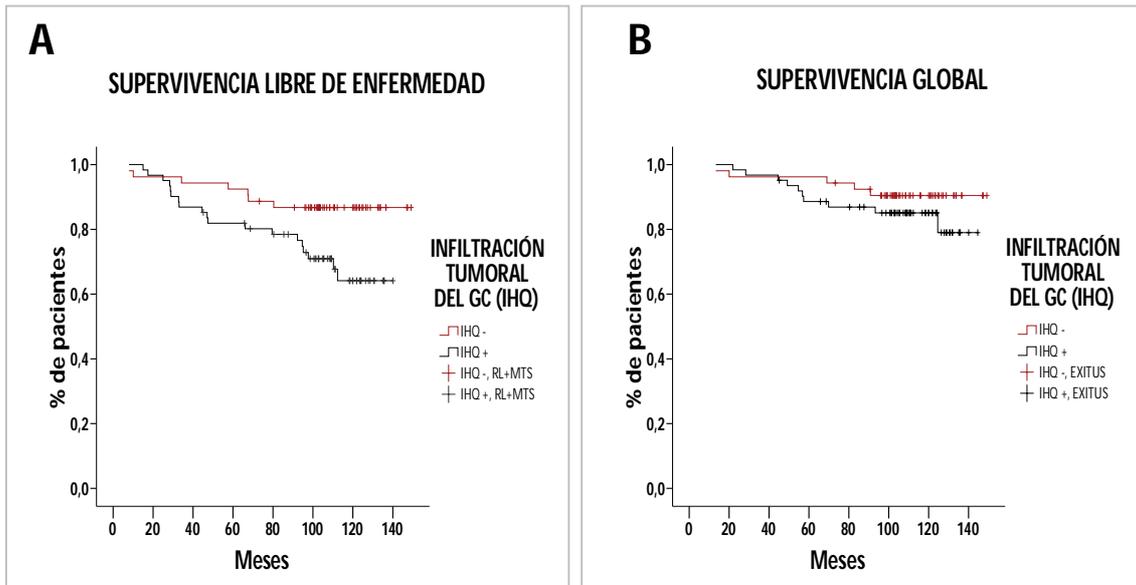


Figura 27.- Representación gráfica mediante las curvas de Kaplan-Meier de la relación entre la Supervivencia Libre de Enfermedad (A) y la Supervivencia Global (B) con la infiltración tumoral del ganglio centinela, valorada por IHQ.

Por el contrario, si se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia libre de enfermedad ($p=0.048$), con una SLE media estimada a los 5 y 10 años del 92 y 88% para el grupo de pacientes sin afectación ganglionar (CMF-) y del 84 y 68% para aquellas pacientes en las que el ganglio centinela estuvo afectado (CMF+) (Tabla 31, Figura 28).

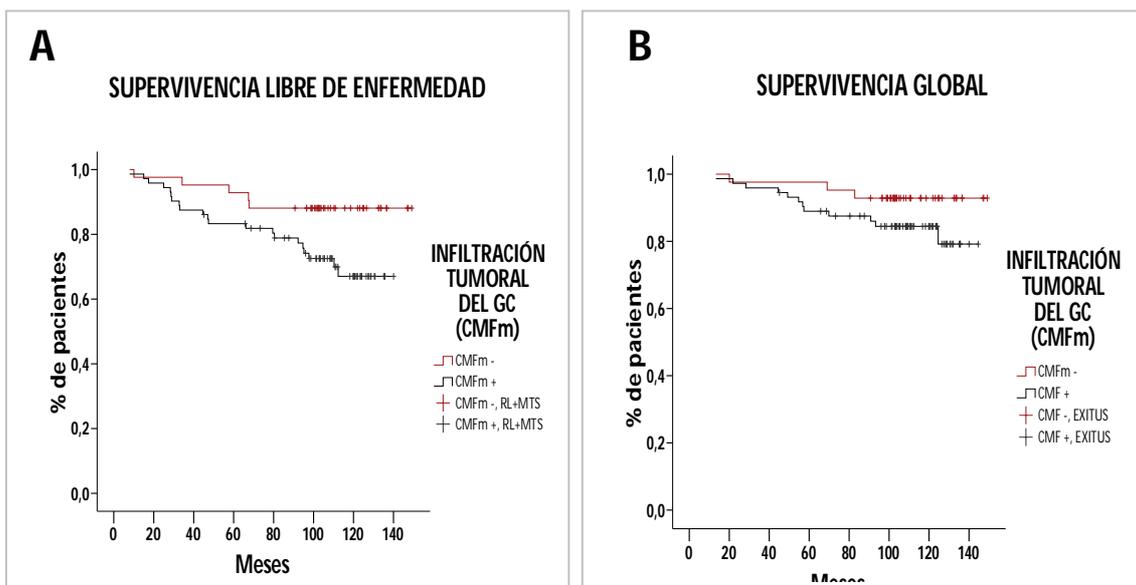


Figura 28.- Representación gráfica mediante las curvas de Kaplan-Meier de la relación entre la Supervivencia Libre de Enfermedad (A) y la Supervivencia Global (B) con la infiltración tumoral del ganglio centinela, valorada por CMFm.

Los resultados son, por tanto, concordantes entre la IHQ y la CMF.

4.6.2.1.6 Asociación de la SG y SLE con los receptores hormonales, p53 Y Her2-neu

Analizadas las mismas variables mostradas en la tabla 28 para valorar su efecto sobre el seguimiento de las pacientes, solo se encontró asociación estadísticamente significativa entre la SLE y la SG con la expresión de la proteína p53 (SLE, $p=0.021$; SG, $p<0.001$). La supervivencia libre de enfermedad estimada a los 5 y 10 años para las pacientes p53 negativas fue del 92 y 83%, y del 78 y 65% para las pacientes p53 positivas (Tabla 31, Figura 29). La supervivencia global estimada a los 5 y 10 años fue del 97% para las pacientes p53 negativas. Esta supervivencia se redujo al 88 y 71% a los 5 y 10 años, respectivamente, en el grupo de las pacientes p53 positivas (Tabla 32, Figura 29).

La presencia o no de receptores para estrógenos, progesterona y el oncogén Her2-neu no se relacionaron estadísticamente ni con la supervivencia global ni con la supervivencia libre de enfermedad (Tabla 31, Tabla 32).

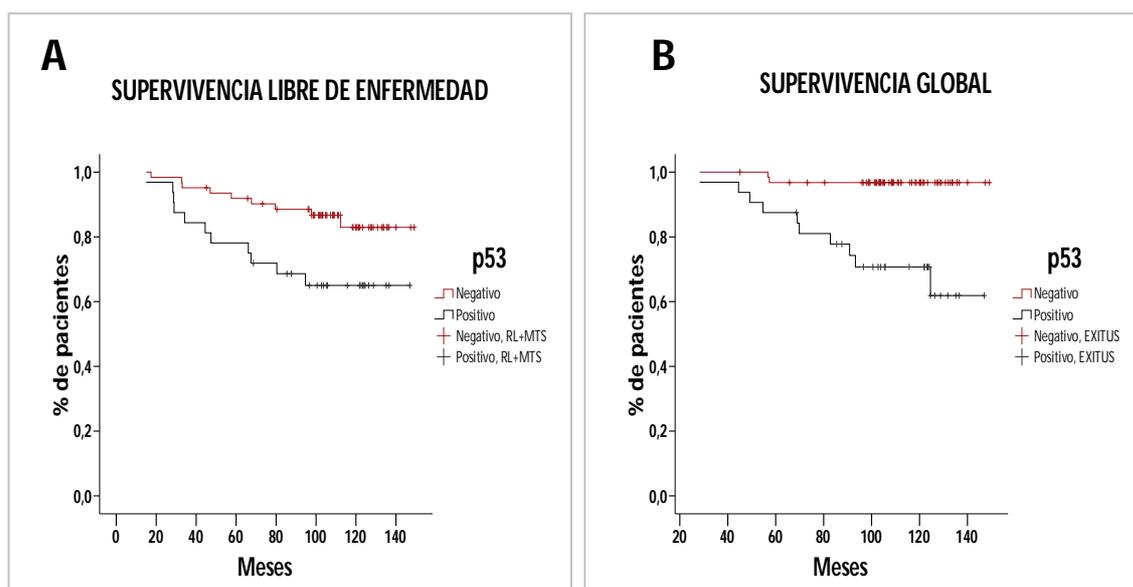


Figura 29.- Representación gráfica mediante las curvas de Kaplan-Meier de la relación entre la Supervivencia Libre de Enfermedad (A) y la Supervivencia Global (B) con la expresión de la proteína p53.

4.6.2.2 Asociación de la SG y SLE con las variables relacionadas con el ciclo celular y estimadas mediante CMFm

4.6.2.2.1 Asociación de la SG y SLE con la ploidía

La aneuploidía se asoció de forma estadísticamente significativa con una reducción de la supervivencia libre de enfermedad a los 5 y 10 años ($p=0.023$). Los pacientes con tumores diploides tuvieron una supervivencia libre de enfermedad del 93 y 87% a los 5 y 10 años, mientras que el grupo de pacientes con tumores aneuploides mostró un descenso de la supervivencia libre de enfermedad hasta el 82 y 63% para los mismos periodos de tiempo (Tabla 31, Figura 30).

La supervivencia global no se vio influenciada de forma estadísticamente significativa por la ploidía tumoral ($p=0.094$) (Tabla 32, Figura 30).

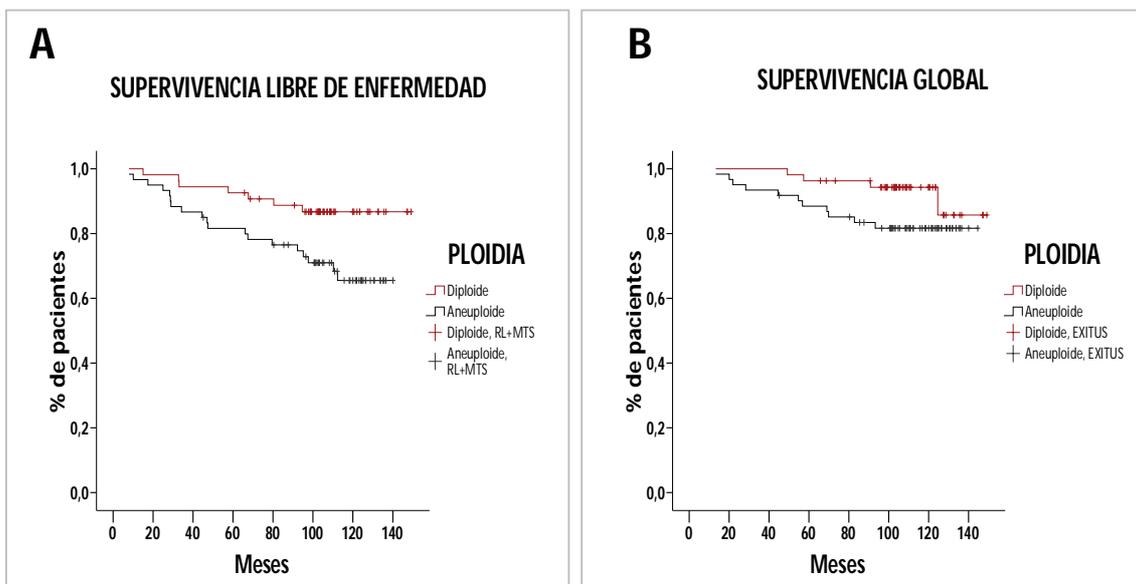


Figura 30.- Representación gráfica mediante las curvas de Kaplan-Meier de la relación entre la Supervivencia Libre de Enfermedad (A) y la Supervivencia Global (B) con la ploidía.

4.6.2.2.2 Asociación de la SG y SLE con la FFS y la Fase de Síntesis

No pudo demostrarse asociación estadísticamente significativa entre la FFS y la SLE ($p=0.249$) (Figura 31, Tabla 31). Sin embargo, sí se demostró asociación estadísticamente significativa entre la FFS y la SG ($p=0.036$): la SG fue inferior en aquellas pacientes con tumores con FFS elevada (Figura 31, Tabla 32).

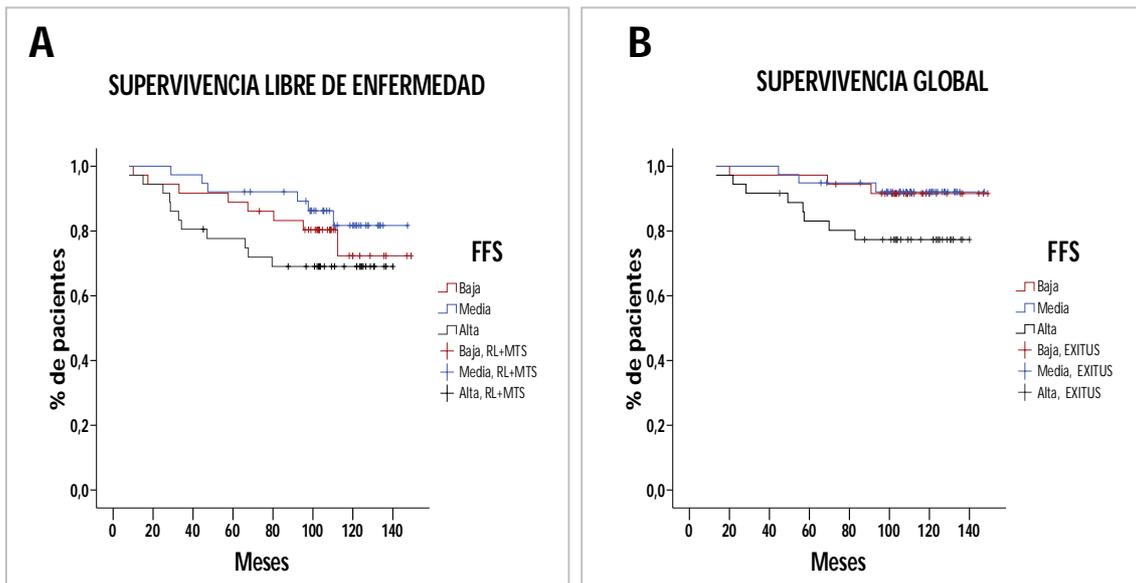


Figura 31.- Representación gráfica mediante las curvas de Kaplan-Meier de la relación entre la Supervivencia Libre de Enfermedad (A) y la Supervivencia Global (B) con la FFS.

Al igual que la fracción de células en fase de síntesis (FFS), la síntesis también se asoció de manera estadísticamente significativa con la SG ($p=0.016$) (Figura 32, Tabla 32), y aunque no se consiguió alcanzar la significación estadística con la SLE ($p=0.251$) se puede observar la tendencia de las curvas de supervivencia (Figura 32, Tabla 31).

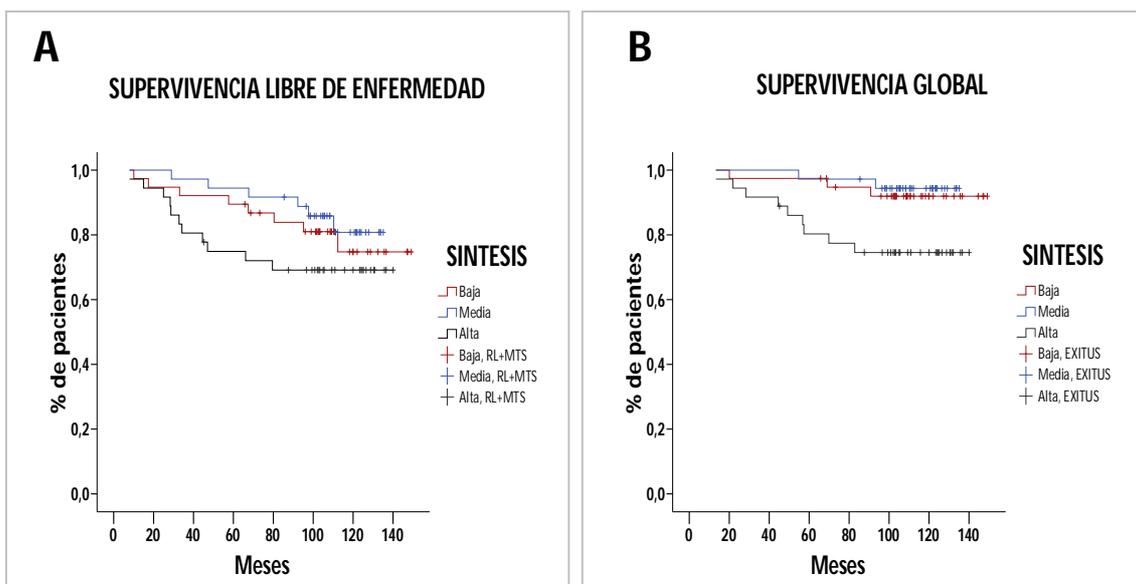


Figura 32.- Representación gráfica mediante las curvas de Kaplan-Meier de la relación entre la Supervivencia Libre de Enfermedad (A) y la Supervivencia Global (B) con la Síntesis.

Tabla 31.- Estimación de la Supervivencia Libre de Enfermedad (SLE) de las pacientes con cáncer de mama en nuestro estudio, teniendo en cuenta las variables clínico patológicas y las relacionadas con el ciclo celular, estimadas mediante la citometría de flujo.

SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD					
Características	N	% pacientes que sobreviven		Media (meses)	p valor
		% a los 5 años	% a los 10 años		
EDAD					
<40	15	87	67	120	NS
40-49	22	77	65	105	
50-59	29	93	86	123	
60-69	21	91	86	135	
>70	27	85	76	116	
TIPO HISTOLÓGICO					
CDI	91	88	77	128	NS
CLI	12	83	60	113	
OTROS	11	82	73	119	
GRADO					
I	15	100	100		0.037
II+III	80	86	73		
TAMAÑO TUMORAL					
T1	50	94	85	136	0.027
T2	61	80	64	109	
ESTADO GANGLIONAR IHQ					
N0	54	93	85	135	0.046
N1	60	82	65	113	
ESTADO GANGLIONAR CMF					
-	41	92	88	136	0.048
+	73	84	68	115	
RE					
+	87	87	73	127	NS
-	22	86	82	121	
RP					
+	84	87	73	126	NS
-	26	89	80	119	
P53					
+	32	78	65	113	0.021
-	62	92	83	136	
HER2-NEU					
+	14	86	79	116	NS
-	85	87	73	127	
PLOIDIA					
DIPLOIDE	54	93	87	137	0.023
ANEUPL	60	82	63	112	
FFS					
BAJA	36	89	73	127	NS
MEDIA	38	92	82	134	
ALTA	36	78	69	109	
SINTESIS					
BAJA	38	90	75	129	NS
MEDIA	36	94	81	124	
ALTA	36	75	69	108	

Tabla 32.- Estimación de la Supervivencia Global (SG) de las pacientes con cáncer de mama en nuestro estudio, teniendo en cuenta las variables clínico patológicas y las relacionadas con el ciclo celular, estimadas mediante la citometría de flujo.

SUPERVIVENCIA GLOBAL					
Características	N	% pacientes que sobreviven		Media (meses)	p valor
		a los 5 años	a los 10 años		
EDAD					
<40	15	88	81	127	NS
40-49	22	91	87	124	
50-59	29	93	93	129	
60-69	21	95	90	141	
>70	27	92	83	123	
TIPO HISTOLÓGICO					
CDI	91	93	87	137	NS
CLI	12	83	84	127	
OTROS	11	91	91	135	
GRADO					
I	15	100	100		NS
II+III	80	94	81		
TAMAÑO TUMORAL					
T1	50	98	94	143	NS
T2	61	86	82	127	
ESTADO GANGLIONAR IHQ					
N0	54	96	90	139	NS
N1	60	88	85	131	
ESTADO GANGLIONAR CMF					
-	41	95	93	142	NS
+	73	91	85	130	
RE					
+	87	87	73	127	NS
-	22	86	82	121	
RP					
+	84	94	88	139	NS
-	26	91	86	122	
P53					
+	32	88	71	121	<0.001
-	62	97	97	146	
HER2-NEU					
+	14	92	84	116	NS
-	85	93	89	138	
PLOIDIA					
DIPLOIDE	54	96	94	142	NS
ANEUPL	60	89	82	127	
FFS					
BAJA	36	97	92	142	0.036
MEDIA	38	95	92	141	
ALTA	36	83	77	119	
SINTESIS					
BAJA	38	97	92	142	0.016
MEDIA	36	97	94	132	
ALTA	36	80	75	116	

4.6.3 ESTIMACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA GLOBAL (SG) Y LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD (SLE) EN FUNCIÓN DE LA PLOIDÍA Y LA FFS. PROPUESTA DE CREACIÓN DE GRUPOS PRONÓSTICO DE LA ENFERMEDAD A TRAVÉS DE LA COMBINACIÓN DE AMBOS PARÁMETROS

Debido a la gran heterogeneidad biológica descrita en el cáncer de mama y a que ésta podría actuar como un factor de confusión a la hora de valorar los datos obtenidos en las diferentes pruebas diagnósticas y pronósticas, decidimos estratificar a las pacientes en función de la ploidía y establecer comparaciones con parámetros asociados a la proliferación celular, pero diferenciando dos grupos de tumores: diploides y aneuploides.

Al valorar la SLE del grupo de tumores diploides en función de la FFS se detectaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0.006$); es decir, dentro del grupo de los tumores diploides, aquellos que presentaron una FFS elevada se asociaron con una menor supervivencia libre de enfermedad (Figura 33).

Del mismo modo, al valorar la SG del grupo de tumores diploides en función de la FFS se detectaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0.014$); es decir, dentro del grupo de los tumores diploides, aquellos que presentaron una FFS elevada se asociaron con una menor supervivencia global (Figura 33).

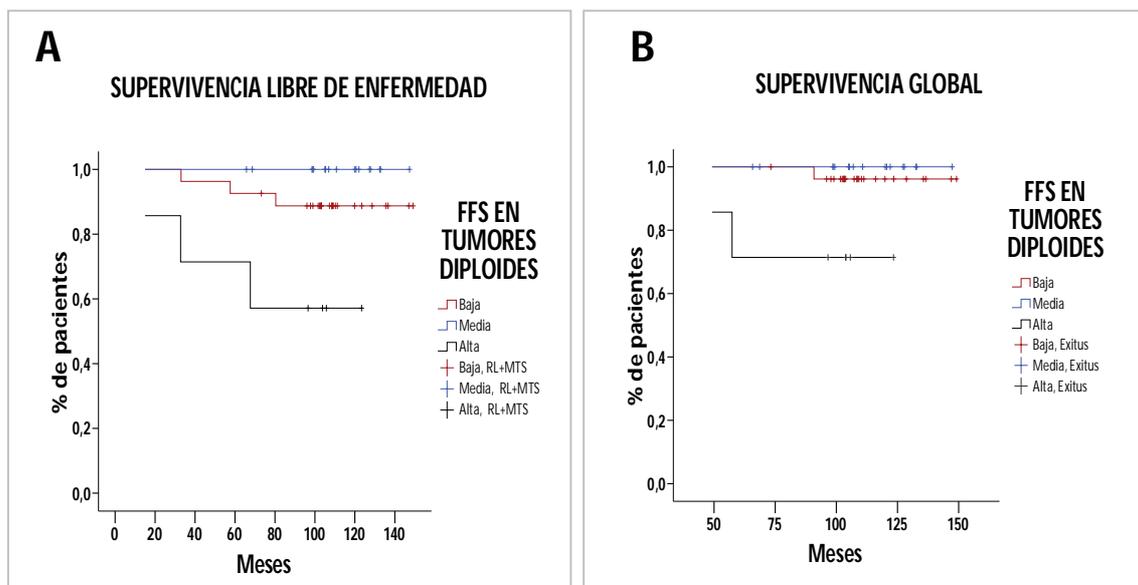


Figura 33.- Representación gráfica mediante las curvas de Kaplan-Meier de la relación entre la Supervivencia Libre de Enfermedad (A) y la Supervivencia Global (B) con la FFS en tumores diploides.

Sin embargo, en el grupo de pacientes con tumores aneuploides, la FFS no se relacionó la significativamente con la SLE ($p=0.280$) ni con la SG ($p=0.740$) (Figura 34).

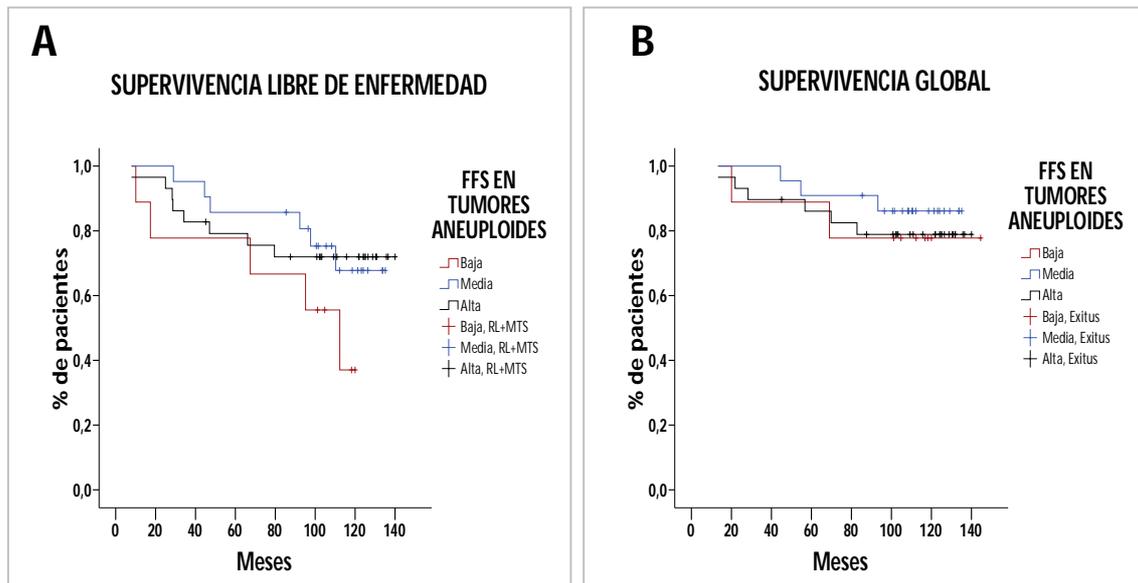


Figura 34.- Representación gráfica mediante las curvas de Kaplan-Meier de la relación entre la Supervivencia Libre de Enfermedad (A) y la Supervivencia Global (B) con la FFS en tumores aneuploides.

Al dividir el grupo global en pacientes con tumores diploides y pacientes con tumores aneuploides, ya se obtienen grupos de diferente pronóstico, especialmente en lo referente al intervalo de tiempo libre de enfermedad, ya que, como se ha visto, la aneuploidía se ha relacionado de forma estadísticamente significativa, con una menor SLE.

Sin embargo, lo más interesante es que, dentro del subgrupo de tumores diploides, hemos observado que la FFS se ha comportado como un factor pronóstico discriminador. Así, los casos con FFS elevada han mostrado un peor pronóstico (menores SLE y SG) al compararlos con aquellos con FFS baja. No ha sido así, sin embargo, en el subgrupo de tumores aneuploides, donde probablemente su mal pronóstico de base enmascare el potencial factor discriminador de la FFS.

5. DISCUSIÓN

5.1 PATRONES DE EXPRESIÓN DE CK18, PLOIDÍA DE ADN Y CICLO CELULAR POR CITOMETRÍA DE FLUJO EN EL TUMOR PRIMARIO .

Como ya se ha comentado, el objetivo central de este trabajo ha sido la evaluación del valor de la técnica de doble marcaje CK18/cuantificación de ADN (que abreviamos como CMFm o CK18/ADN) en el estudio de los ganglios centinela con fines diagnósticos y su comparación con las técnicas convencionales de inmunohistoquímica. La búsqueda de células tumorales en los ganglios centinela por CMFm, que se plantea como una alternativa de muy superior sensibilidad y especificidad, precisa de unas estrategias de reconocimiento de las células del tumor primario. Para ello, el primer paso consistió en determinar, en el tumor primario, los patrones de expresión de CK18 y de ploidía. Posteriormente, como se comentará en el punto 5.4 de la Discusión, se buscaron células tumorales en los ganglios centinela, basándonos en los patrones descritos en el tumor primario.

Este análisis del tumor primario nos llevó a otro objetivo adicional: el estudio del valor pronóstico de los parámetros de ploidía y ciclo celular estimados en los tumores primarios (revisado en los puntos 5.5 y 5.6 de la Discusión) pues todavía se cuestiona la validez de estos parámetros. Asimismo, también nos planteamos su posible utilidad en grupos de pacientes concretos, como son las pacientes con cáncer de mama en estadios iniciales. Con el marcaje CK18/ADN se obtuvo información sobre el ciclo celular (fase de proliferación) de las células tumorales en el tumor primario en el momento del diagnóstico de la enfermedad para detectar grupos de riesgo, algo especialmente importante en tumores ya seleccionados por su buen pronóstico a priori, como son los tumores en estadios iniciales (TI y TII).

En este sentido, la determinación de los patrones de expresión de CK18 y de ploidía, realizada en todos los tumores primarios, ha demostrado ser muy útil al combinar dos marcadores tumorales: 1) la CK18, que muestra una gran sensibilidad, pues es un marcador de células epiteliales que se expresa en casi la totalidad de los tumores de mama y en una gran proporción de células tumorales, pero no lo expresan las células del ganglio centinela (226, 250), y 2) ploidía de ADN, ya que en el 54.4% de los tumores de mama incluidos en este estudio se detecta al menos un clon aneuploide (Tabla 14).

Estudios previos han demostrado que la valoración conjunta de la ploidía del ADN con la expresión de la citokeratina 18 es un abordaje más sensible para identificar cantidades muy pequeñas de células tumorales de cáncer de mama en sangre periférica (222, 244), al igual que para la identificación de multiploidía en tumores de mama primarios (251-253). La estrategia usada en este estudio -doble marcaje: CK18 para la

célula epitelial y yoduro de propidio (IP) para marcar el ADN- es la técnica recomendada para detectar aneuploidía en el cáncer de mama y ha demostrado aumentar la capacidad de detección no sólo de de aneuploidía, sino también de multiploidía en las células tumorales (222, 244). Esto ha permitido un conocimiento más profundo del tumor primario y puede facilitar la detección de enfermedad mínima residual en los ganglios linfáticos. Con esta técnica, nosotros hemos detectado una incidencia de aneuploidía en este estudio del 54.4% (68 de 125 pacientes, Tabla 14), ligeramente inferior a la descrita por Frierson en una revisión de 56 estudios, en la que describe una porcentaje de aneuploidía en el total de los carcinomas de mama estudiados del 63% (127). Otros autores también refieren porcentajes de aneuploidía elevados en sus series: es el caso de Symmans (254) que publica un 65%, o Feitcher (255) con un 71%. Sin embargo, todos estos estudios analizan tumores avanzados o de gran tamaño, por lo que su muestra difiere notablemente de la nuestra. Cuando los tumores estudiados son seleccionados en función del estadiaje tumoral, el porcentaje de aneuploidía encontrado es muy similar al demostrado en nuestro estudio. Así, Tsutsui et al. (256) refieren un porcentaje de aneuploidía del 50.4% al estudiar 653 tumores sin evidencia de afectación axilar al diagnóstico y Ewers et al. (257), en un estudio con 638 pacientes, publican un porcentaje de aneuploidía del 51-63% en tumores en estadios T1-T2.

La incidencia en nuestra serie de casos con más de un clon o población tumoral en función de la ploidía fue más alta (51.2%) que la referida en la literatura revisada, en la que el rango varía desde 1 al 19% (251-253). Esta mayor incidencia de heterogeneidad en cuanto a ploidía con respecto a la literatura es fácil de explicar por la técnica usada en nuestro trabajo. La utilización del marcaje con CK18 simultáneamente con la cuantificación de ADN permite detectar poblaciones celulares que habrían pasado desapercibidas si la cuantificación de ADN se hubiera hecho sin el marcaje de las células tumorales con CK18 (258).

Con respecto al patrón de expresión de citokeratina, hay que resaltar la alta heterogeneidad y complejidad detectada en este estudio, que ya fue descrita por Moll et al. en 1983 (259) y que hace referencia a tumores de mama CK18 negativos, con expresión débil de CK18, con expresión media, alta (similar a la de las células epiteliales normales) e incluso con sobreexpresión de CK18 (expresión superior a la de las células epiteliales normales). Trask et al. (260) también han estudiado la diferente expresión de citokeratinas en cultivos celulares de lesiones mamarias, encontrando que los cultivos de células epiteliales mamarias normales producen citokeratinas 5, 6, 7 y 14, mientras que las células tumorales producen citokeratinas 7, 8 y 18 en mayor cantidad. Sin embargo, Franzén et al. (261) en un estudio en el que se valoró la diferente expresión de proteínas del citoesqueleto celular, entre las que se incluyó la CK18 tanto en lesiones mamarias

benignas (fibroadenomas) como malignas (carcinomas), publicaron que la expresión de CK 18 fue menor en los carcinomas respecto a los fibroadenomas.

En este estudio, el 98% de los casos (N=122) mostró expresión de CK18 ($\geq 20\%$ células tumorales positivas) mediante CMFm y en el 86% de ellos (N=107) esta expresión estuvo presente en más del 50% de las células tumorales (Tabla 12). Dicho patrón sirvió de ayuda para la búsqueda de infiltración tumoral en el ganglio centinela, aunque llama la atención que en algunos casos con infiltración pequeña, la expresión de CK18 detectada en el ganglio centinela fue discretamente superior a la que se había observado en el tumor primario. Esto probablemente signifique que la expresión de CK18 puede estar levemente afectada por artefactos técnicos, como ya se ha sugerido en estudios previos (262).

Como ya se ha comentado, en este estudio detectamos un alto grado de heterogeneidad tanto en lo referente a la ploidía del ADN como en la expresión de CK18 en el tumor primario. Meyer (263), Beerman (264), Prey (265), Fuhr (266) y otros autores (267-270) también han informado de la existencia de heterogeneidad cuando se estudian diferentes muestras de tumor, lo que puede tener importancia desde el punto de vista del pronóstico (268, 271). Aunque la heterogeneidad celular es mayor en los tumores más grandes, varios autores afirman que ésta es una característica intrínseca del cáncer de mama, y que está presente incluso en tumores de pequeño tamaño, por lo que se propone un muestreo múltiple de diversas zonas del tumor a la hora de analizarlo, para así tener una muestra más representativa de todas las poblaciones celulares que lo forman (265, 266). La presencia de más de una población celular en un mismo tumor tiene implicaciones pronósticas, tanto en la potencial respuesta a los agentes quimioterápicos u hormonales como en el desarrollo espontáneo de nuevas poblaciones clonales que podrían modificar diferentes características del tumor. Algunos de estos clones podrían ser genéticamente más inestables que los anteriores, lo que podría asociarse tanto a un aumento de la resistencia del tumor a los fármacos como al desarrollo de subpoblaciones con un mayor poder metastásico o de diseminación a distancia (265). De hecho, algunos autores (251) han publicado que en las pacientes con tumores primarios multiploides, una subpoblación de células aneuploides fue la dominante en las metástasis ganglionares. El hecho de que en los ganglios centinela persistan algunos clones tumorales y no otros puede tener una gran trascendencia, pues su significado podría estar en relación con que diferentes clones tumorales tengan diferente poder metastásico y que la aneuploidía sea una propiedad que incremente la capacidad metastásica de las células tumorales, como ya han sugerido otros autores (251, 254).

A pesar de que en este estudio no se utilizó el ciclo celular como parte del patrón de búsqueda de infiltración tumoral del tumor primario en el ganglio centinela, dado que la proliferación celular es una característica específica de cada tumor primario, analizaremos también en este apartado los hallazgos encontrados respecto a este parámetro.

La proliferación celular de los tumores primarios se ha estimado en el presente estudio en base a dos variables: el porcentaje de células en fase de síntesis (S) y de G2/Mitosis, también denominada Fracción de la Fase S o FFS. En la práctica, la gran complejidad del tumor en cuanto a diferentes poblaciones de distinta ploidía dificulta el cálculo preciso de la fase de síntesis. Con la citometría multiparamétrica (CK18/IP) es posible calcular la proliferación celular de cada clon de forma individualizada, al menos en la mayoría de los casos. En concreto, en nuestra serie tan sólo fue imposible realizar el cálculo de la proliferación (porcentaje de células en fase de síntesis) en cuatro de los 125 casos, debido a la superposición de los diferentes picos aneuploides. El porcentaje medio calculado en este estudio para la síntesis fue del 4.8%, y del 10.2% para la FFS (Tabla 15), valores ligeramente superiores a los estimados por otros autores, como Hupperets et al. (272) 7.86%, O'Reilly et al. (273) 7.1%, Kang et al. (252) 4.92% o Feitcher et al. (255) 6.1%, pero similares a los estimados por Masood (274), 10% o Witzig et al. (275) 9%. La utilización de la CK18 para el marcaje de las células epiteliales podría estar en relación con el nivel más elevado de la FFS encontrado en nuestro estudio respecto al referido por otros autores, pues es un hecho descrito en algunas publicaciones, especialmente en tumores diploides (258).

Siguiendo las recomendaciones de la Revisión de Consenso sobre la utilidad clínica de la Citometría de Flujo en el Carcinoma de Mama (131), tanto la S como la FFS se transformaron en variables categóricas utilizando terciles (Tabla 16). Así, en el caso de la S, el p33 correspondió al 2% y el p66 al 5,7%. Se crearon 3 categorías de acuerdo a dichos terciles: S baja ($\leq 2\%$), S media (2.01-5.7%) y S alta ($> 5.71\%$). Por su parte, el p33 y el p66 para la FFS fueron, respectivamente, 5.65% y 12.55%. De esta manera se crearon 3 categorías para la FFS: FFS baja ($\leq 5.65\%$), FFS media (5.66-12.55%) y FFS alta ($> 12.56\%$). Los valores estimados en nuestro estudio para la FFS categorizada en terciles son similares a los descritos por Sigurdsson et al. (276), pero superiores a los publicados por Pinto et al. (277) o Bezic et al. (278).

Finalmente, decidimos valorar la FFS en función de la ploidía tumoral. Se observó una relación estadísticamente significativa ($p < 0.0001$) entre ambos parámetros, siendo la mediana de la FFS para los tumores aneuploides de 12.60%, más del doble que en los tumores diploides (5.40%) (Tabla 17). Esta asociación también se mantuvo cuando

la FFS se estratificó en terciles, en línea con los hallazgos descritos en múltiples publicaciones (275, 277-279).

Como conclusión a este primer punto, podemos decir que la combinación CK18/IP es una técnica muy sensible para detectar diferentes patrones de CK18 y ploidía de ADN que proporciona una descripción detallada de los diferentes clones tumorales presentes en el tumor primario. Esto permite una caracterización de las células tumorales que es útil en sí misma por contribuir al conocimiento del tumor primario, pero que es también una herramienta muy valiosa para la búsqueda de infiltración tumoral en los ganglios centinela.

Mediante esta técnica de doble marcaje CK18/IP hemos detectado una incidencia de aneuploidía en este estudio del 54.4%, en consonancia con lo descrito por otros autores en tumores de características similares (256, 257), pero una incidencia de heterogeneidad tumoral (en el sentido de detección de clones tumorales con diferente ploidía de ADN o distinta expresión de CK18) mayor que la encontrada en la literatura revisada (251-253). Una posible explicación a este hallazgo es que la utilización de este doble marcaje CK18/IP permite detectar poblaciones celulares que habrían pasado desapercibidas si no se hubiera usado marcaje CK18/ ADN (258).

Con respecto al patrón de expresión de CK18, el 98% de los casos mostró expresión de CK18 en más de un 20% de las células tumorales y el 86% de ellos en más del 50%. Esta alta expresión de la CK18 en las células del tumor primario la convierte en un marcador sensible y específico para la búsqueda de infiltración tumoral en el ganglio centinela.

En cuanto a la proliferación celular, tanto la síntesis (S) como la fracción de fase de síntesis (FFS) calculadas en este estudio fue ligeramente superior a la media estimada por otras publicaciones, lo que podría también estar en relación con la técnica de doble marcaje CK18/IP utilizada, al hacer los cálculos sobre la, o las poblaciones tumorales de forma individualizada. Los tumores aneuploides se asociaron de manera estadísticamente significativa con FFS más elevadas que los tumores diploides (275, 277-279).

5.2 COMPARACIÓN DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE CK18 Y DE LA PLOIDÍA DE ADN POR CITOMETRÍA DE FLUJO DEL TUMOR PRIMARIO CON EL DE LAS CÉLULAS INFILTRANTES EN LOS GANGLIOS CENTINELA POSITIVOS MEDIANTE LA CMFm.

Como ya se ha comentado en diferentes apartados de esta tesis, el factor pronóstico con mayor relevancia en el cáncer de mama es la afectación metastásica de los ganglios axilares. Existen diversas teorías para explicar la aparición de células tumorales a nivel ganglionar, algunas aparentemente muy dispares pero que, sin embargo podrían ser complementarias. La primera de ellas propone que la metástasis podría originarse por la diseminación de una población celular perteneciente al tumor primario, que fuera totalmente similar al tumor de origen. Por el contrario, la segunda teoría plantea la posibilidad de que dentro del tumor primario exista una subpoblación celular más agresiva, con mayor capacidad de diseminación, que sea quien finalmente de lugar a la metástasis.

Para tratar de identificar la existencia de algún tipo de estirpe celular en el tumor primario capaz de producir metástasis ganglionares con más facilidad que otras, se procedió a comparar la carga tumoral del ganglio con la detectada en el tumor primario en términos de patrones de ploidía y de expresión de CK18 en los 80 casos en los que se detectó infiltración del mismo por citometría de flujo.

Con respecto al patrón de ploidía, en el 67% de los ganglios infiltrados (N=53) se detectaron los mismos clones que en el tumor primario, con similares patrones de ploidía y de expresión de CK18 (Figura 16, Figura 18). Sin embargo, en 27 casos (33%) se objetivaron diferentes patrones de ploidía en el GC con respecto al TP (Tabla 20). La situación más frecuente fue la pérdida (en el sentido de no detección) de uno (o más) clones (22 casos, 27%), aunque en 4 casos (5%) se detectó una población celular aneuploide en el ganglio centinela que no estaba presente en el tumor primario. Esto puede interpretarse en base a dos situaciones: 1) que la descrita heterogeneidad tumoral (distribución heterogénea de los clones tumorales) entre diferentes zonas tanto del TP como del GC estudiado no permitiera la detección de alguno de los clones que pudieran estar presentes (es decir, una cuestión de muestreo) o 2) la hipótesis de una diferente capacidad metastática entre clones.

En este sentido, también existe cierta controversia en la literatura revisada. Así, mientras que la mayor parte de los autores encuentran una correspondencia prácticamente idéntica entre los clones tumorales del tumor primario y los detectados en los ganglios metastásicos (254, 255, 272, 280), otros encuentran divergencias llamativas

(252, 281). Sin embargo, ambas posturas podrían no ser contrapuestas, ya que es posible que, aunque la mayor parte de los clones tumorales presentes en el tumor primario sean reconocidos en el ganglio metastásico, existan líneas celulares con alteraciones genéticas más importantes que generen poblaciones celulares diferentes y den lugar a una evolución clonal distinta y probablemente más agresiva. Así, Alam et al. (251) afirman que en algunas pacientes con tumores primarios multiploides, una subpoblación de células primarias aneuploides fue la dominante en las metástasis ganglionares. Este hecho podría sugerir que haya patrones de ploidía con un mayor poder metastásico (251, 254).

En los casos que consideramos que los mismos clones detectados en el GC estaban presentes en el TP correspondiente, los valores del índice de ADN fueron prácticamente idénticos.

La expresión de CK18 demostró ser un marcador muy específico para la detección de células epiteliales tumorales en el ganglio centinela, ya que en ninguno de los 33 ganglios usados como grupo control en este estudio se detectaron eventos CD18+ o aneuploides. Aunque hubo algunos eventos que podrían corresponder a células CK18+ diploides, este número fue siempre inferior a 10 y en ninguno de ellos el conjunto de los eventos constituyó una población homogénea. En base a estos resultados, el ganglio centinela se consideró infiltrado cuando detectó un número igual o superior a 10 eventos CK18+ aneuploides y/o diploides en el mismo, en base a nuestros resultados con los controles y a la bibliografía consultada (246).

Así, con respecto a la expresión de CK18, el estudio comparativo mostró que, en la mayoría de los casos estudiados (54/80, 67%), el patrón de CK18 del clon o de los clones detectados en el ganglio centinela fue similar al mismo clon detectado en el tumor primario. Sólo en 27 casos (33%) se detectó una expresión diferente de CK18 entre TP y GC. De ellos, en 26 casos la intensidad de expresión fue mayor en el ganglio centinela, mientras que en 1 caso fue menor (Tabla 21). No tenemos una explicación para el único caso en el que la expresión de CK18 en el GC fue inferior, aparte de que podría haber sido uno de los clones metastásicos el que infiltrara el GC. De hecho, se ha descrito la pérdida de expresión de CK18 (o el descenso de la misma) como reflejo de la transformación neoplásica celular (282). En cuanto a los casos en los que la expresión de CK18 se incrementó no podemos descartar que se trate de una cuestión relacionada con que, al ser menor la cantidad de células tumorales, la competición por las moléculas del anticuerpo descienda, con el correspondiente incremento de la señal de fluorescencia.

Por lo que conocemos, hasta este momento esta es la primera vez que se evalúa la diferente expresión de CK18 entre TP y GC. El único precedente relativo fue publicado

por Franzén et al. (261), que describen la relación de este marcador en 2 tumores respecto a sus ganglios metastásicos correspondientes. En su estudio, también refieren una expresión similar de la citokeratina entre las diferentes áreas del mismo tumor y entre el tumor y las metástasis, aunque al tratarse de una muestra tan pequeña (tan sólo dos casos) la significación es cuestionable. Nuestros resultados, obtenidos de una muestra mucho mayor (80 tumores comparados con sus correspondientes ganglios centinela), apoyan estos hallazgos.

Puesto que no hemos usado métodos objetivos para medir la intensidad de expresión de CK18, sino que las variaciones en intensidad de CK18 se han valorado por comparación de unas poblaciones con otras (patrones de expresión), nos limitamos a constatar estas impresiones en espera de que estos resultados puedan ser corroborados o refutados.

Como conclusión a este segundo punto, podríamos decir que con respecto al patrón de ploidía, existió una gran concordancia entre GC y TP (67% de los casos). En los casos con diferente patrón de ploidía (33%), lo más frecuente fue la pérdida de algún clon tumoral, lo que pensamos que podría ser debido a dos situaciones: 1) la selección de muestra como reflejo de la distribución heterogénea de los diferentes clones tumorales en la misma o 2) el potencial metastásico diferente entre los diversos clones tumorales.

El hecho de que en el 5% de casos de este estudio se haya detectado en el ganglio centinela un clon tumoral que no estaba presente en el tumor primario apoya la primera teoría, pero no descartamos la posibilidad de la existencia de diferente potencial metastásico entre clones tumorales, como también afirman otros autores (251).

Con respecto a la comparación de la expresión de CK18 entre tumor primario y ganglios centinela, también hubo una gran concordancia (67% de los casos). Las diferencias encontradas podrían ser achacadas al proceso de permeabilización de membrana, que se llevó a cabo mediante un proceso de congelación/ descongelación previamente al marcaje con el anticuerpo anti-CK18. En este sentido, la mayor expresión de CK18 en GC frente al TP estaría relacionada con una mayor disponibilidad de moléculas de anticuerpo para la misma cantidad de determinante antigénico por célula, aunque no se puede descartar que las diferencias de expresión de CK18 sean debidas a otros factores no muy estudiados en la literatura.

5.3 UTILIDAD DEL USO DE LOS PATRONES DE EXPRESIÓN DE CK18 Y PLOIDÍA DE ADN COMO PRUEBA DIAGNÓSTICA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LA INFILTRACIÓN TUMORAL DEL GANGLIO CENTINELA. COMPARACIÓN CON EL ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA Y CON LA EVOLUCIÓN CLÍNICA DE LAS PACIENTES.

Como se ha comentado en la Introducción de este trabajo, el cáncer de mama es el tumor maligno más frecuente de la población femenina española, y representa entre el 28% de todos los tumores incidentes (1). La posibilidad actual de que una mujer española sufra un cáncer de mama antes de cumplir 75 años se aproxima a un 5%. Esto significa que una de cada 20 mujeres desarrollará un cáncer de mama antes de esa edad y que una de cada 12 lo padecerá a lo largo de su vida (283).

La presentación clínica del cáncer de mama en nuestro medio ha cambiado radicalmente a lo largo de los últimos veinte años. Las campañas de información y concienciación respecto a este problema, así como el *screening* poblacional mediante mamografías periódicas, han tenido como resultado el diagnóstico cada vez más precoz de la enfermedad y, por tanto, el abordaje de tumores cada vez de menor tamaño (5).

Aunque el tamaño tumoral es un factor pronóstico a tener en cuenta, y de hecho es uno de los parámetros incluidos en el estadiaje tumoral (TNM), el factor pronóstico más importante en las pacientes con cáncer de mama sigue siendo la afectación ganglionar axilar, ya que es indicativa de la extensión de la enfermedad más allá de la glándula mamaria (26, 284). Hasta hace poco tiempo, la resección quirúrgica de los ganglios axilares (linfadenectomía axilar) ha sido el procedimiento estándar en el estadiaje axilar. Sin embargo, a pesar de la utilidad indiscutible de la linfadenectomía axilar para el conocimiento del estado ganglionar, este procedimiento no está exento de riesgos y complicaciones quirúrgicas, así como de una morbilidad posquirúrgica nada despreciable, relacionada sobre todo con la aparición de dolor crónico, infecciones, linfedema, seroma y limitación o in capacidad funcional del hombro afecto (285, 286).

Gracias al diagnóstico precoz del cáncer de mama, los tumores a tratar son cada vez más pequeños, lo que ha puesto en evidencia en los últimos años la realización de un gran número de linfadenectomías axilares en las que no se encontró afectación metastásica ganglionar en el análisis anatomopatológico. Esto ha hecho plantearse a los cirujanos oncológicos mamarios la necesidad de buscar una alternativa quirúrgica que permita estadiar correctamente los casos de tal forma que se realice la linfadenectomía

axilar sólo en los casos con ganglios infiltrados, evitándose así en una parte de las pacientes una morbilidad postoperatoria innecesaria (287-289).

La biopsia selectiva del ganglio centinela es un procedimiento relativamente novedoso y que se plantea como una alternativa real, validada científicamente, a la linfadenectomía axilar clásica para el estadiaje axilar y que está asociada a una menor morbilidad postquirúrgica. El fundamento de esta técnica se basa en considerar que el ganglio centinela es el primer nódulo linfático que recibe el drenaje del tumor primario, y por tanto su afectación estará asegurada en el caso de enfermedad diseminada. Pero si es posible descartar con certeza la afectación metastásica del ganglio centinela, se podría afirmar con la misma certeza que el resto de la cadena ganglionar no estará afectada y evitar así la linfadenectomía axilar clásica en estas pacientes.

La aparición de un resultado falso negativo en el ganglio centinela puede tener como consecuencia una infravaloración en el estadiaje tumoral y, por tanto, el tratar como un cáncer no diseminado a uno que, sin embargo, presenta afectación ganglionar axilar. Por otro lado, la aparición de un resultado falso positivo conllevará la realización de una linfadenectomía axilar reglada en una paciente en la que ésta podría haberse evitado. Por estos motivos, las pruebas que permitan detectar células metastásicas a nivel del ganglio centinela deben tener una alta sensibilidad y especificidad.

Aunque muchos estudios han demostrado que las biopsias del ganglio centinela pueden determinar el estado axilar con precisión, la sensibilidad de dicho procedimiento para la detección de micrometástasis en el ganglio centinela ha sido variable. Los métodos que se han utilizado de forma clásica han sido la tinción de múltiples secciones del ganglio con hematoxilina-eosina y la tinción con citokeratinas para el estudio ganglionar mediante inmunohistoquímica (290).

Durante los últimos años, la aparición del método OSNA (One-Step Nucleic Acid Amplification o amplificación de ácido nucleico en un paso) ha supuesto una auténtica revolución en la identificación de afectación metastásica del ganglio centinela (GC). Este método, que se viene realizando de forma rutinaria en el Hospital Universitario de Salamanca desde el año 2009, se basa en una reacción de amplificación mediada por "bucles" del ARNm de la CK19 (ARNm-CK19) en tiempo real, a temperatura isoterma (65°C), con una duración total del procedimiento de unos cuarenta minutos. La gran aportación del OSNA consiste en estandarizar el estudio del GC en su totalidad, sin pérdida de tejido y en tiempo intraoperatorio, lo que evita la necesidad de reevaluación anatomopatológica y, por tanto, de reintervención quirúrgica en los casos en que el ganglio centinela fue diagnosticado como negativo en la biopsia rápida intraoperatoria y resultó ser positivo en el análisis minucioso posterior. El método OSNA tiene, como todas

las técnicas diagnósticas, algunas limitaciones. La más importante de ellas se relaciona con los carcinomas de mama que no expresan la CK19 y cuyas metástasis podrían no ser detectadas por la reacción de amplificación de la CK19. Otra limitación posible es la inviabilidad de realizar un estudio histológico del ganglio, lo que puede conllevar pérdida de información en algunos casos al no poder evaluar, por ejemplo, la infiltración capsular, parámetro al que algunos autores han atribuido un gran valor pronóstico (291-293), el número de focos metastásicos o la localización de los mismos.

La técnica de doble marcaje CK18/ADN por citometría de flujo es una técnica muy rápida y con una cada vez más alta sensibilidad y especificidad, como ya se expuso en el apartado 5.1. Como ya se ha comentado, en tumores sólidos de origen epitelial, la combinación de la cuantificación de ADN y el marcaje celular con CK18 (222) permite la exploración de dos parámetros que funcionan juntos como un marcador tumoral casi perfecto. Prácticamente, la totalidad de los carcinomas de mama expresan la CK18 (294) y la mayoría de ellos tienen clones aneuploides (251, 254, 266). En conjunto, estos dos marcadores permiten identificar, en el tumor primario, los diferentes clones tumorales y ofrecer así un patrón de ploidía y expresión de CK18 característico de cada tumor, además de poder ofrecer información sobre la tasa de proliferación del tumor. El patrón de ploidía y CK18 funciona como una huella que se puede utilizar para buscar en los ganglios centinela células con ese patrón. Como los ganglios centinela son tejido ganglionar y por tanto CK18 negativo (CK18-), cualquier evento CK18 positivo (CK18+) sería indicativo de infiltración ganglionar. Si, además, estas células son aneuploides, con toda seguridad se puede asumir que se trata de células del tumor primario que han alcanzado el ganglio centinela.

Una vez establecido el valor teórico de esta estrategia, nos propusimos evaluar el doble marcaje CK18/IP por citometría de flujo para la detección de enfermedad mínima residual (metástasis y micrometástasis) en los ganglios centinela de nuestro grupo de pacientes. En un primer paso comparamos esta técnica con la que hasta ese momento era la técnica *gold standard* para el diagnóstico de la afectación metastásica del ganglio centinela: el estudio anatomopatológico por inmunohistoquímica. Así, realizamos un estudio de validez de prueba diagnóstica para la CMFm calculando su sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo con respecto a la anatomía patológica (IHQ).

La sensibilidad de la CMFm obtenida en este estudio ha sido elevada (93%), siendo la especificidad del 73% y los valores predictivos positivo y negativo del 81% y 89%, respectivamente (Tabla 23).

Tras una revisión exhaustiva de la literatura científica, prácticamente sólo dos artículos (253, 295) exploran de manera específica la utilidad de la CMF para la detección de infiltración metastásica en los ganglios linfáticos en pacientes con cáncer de mama. Sin embargo, ambos estudios utilizan métodos diferentes a los usados en este trabajo. Joensuu et al. (295) analizan muestras de ganglio afecto obtenidas mediante punción aspiración en aguja fina (PAAF), con un tamaño muestral de 155 casos (ganglios con afectación metastásica) y 60 controles (ganglios sanos).

Por su parte, Leers et al. (253) llevan a cabo su estudio en muestras de ganglios centinela fijados en formol e incluidos en parafina, con un tamaño muestral de 98 pacientes de las que se analizan 238 ganglios. En ambos estudios la sensibilidad y la especificidad son muy elevadas: Joensuu et al. encuentran una sensibilidad del 91%, una especificidad del 95% y un valor predictivo positivo del 92%. Leers et al. alcanzan una especificidad del 100% en la CMF respecto a la tinción con hematoxilina-eosina o la inmunohistoquímica aisladamente. La sensibilidad de este estudio varió entre el 74 y el 89%. Por otro lado, el estudio de Joensuu trabaja con niveles de detección de células tumorales máximos de 10^2 (1 célula tumoral en 100 normales) y Leers considera que un GC está infiltrado cuando el porcentaje de células CK18+ es superior al 1%. Este comentario es relevante teniendo en cuenta que en este estudio partimos de niveles de detección más bajos (1 célula tumoral entre valores de células normales que oscilaron entre 2×10^3 y 10^7 , con un valor medio de 10^5). Asimismo, el número medio de células analizadas en nuestro estudio fue muy elevado; analizamos una media de 7.5×10^5 células, con un valor mínimo de 4.7×10^4 y máximo de 1×10^7 .

Con estas premisas, nuestros resultados son concordantes con los demostrados en estudios previos, con ciertas puntualizaciones. Tras comparar la capacidad de detección de células metastásicas en el ganglio centinela de la CMF respecto a la IHQ convencional, nosotros encontramos una sensibilidad del 93%, una especificidad del 73%, un VPP del 81% y un VPN del 89% (Tabla 23). Es decir, sensibilidad superior a la detectada por Joensuu (295) y Leers (253), aunque la especificidad es ligeramente inferior, seguramente basada en los niveles de detección superiores de la técnica explorada en este estudio.

No obstante, parece relevante señalar que los estudios referidos difieren bastante del nuestro, tanto en casuística como en la metodología seguida. En el caso de Joensuu et al. (295), la muestra del estudio estuvo formada por al menos 11 tipos diferentes de tumor (mama, melanoma, cabeza y cuello, pulmón, gastrointestinal, útero, riñón, tejidos blandos, esófago, tiroides y una última categoría que denominan "otros"), sin que en ningún lugar del estudio se haga referencia al estadio tumoral en el momento del diagnóstico. La punción (PAAF) se lleva a cabo en adenopatías palpables, lo que hace

presuponer un estadio avanzado, por lo que dichos tumores son difícilmente equiparables a nuestra muestra de estudio: tumores en estadios iniciales (T1, T2), sin afectación ganglionar evidente (N0). Esta puede ser también la explicación para que la mediana de la FFS de su estudio sea superior a la nuestra (12% respecto a 9.1%). De hecho, al separar nuestra muestra en tumores diploides y aneuploides, encontramos una mediana para la FFS de 5.40% y 12.60%, respectivamente, es decir, la mediana de la FFS global en el estudio de Joensuu et al. es prácticamente igual que la obtenida en nuestro estudio para los tumores con aneuploidía demostrada, por lo que se pone en evidencia que las poblaciones que forman parte de cada estudio son altamente discrepantes y, por lo tanto, difícilmente comparables.

Leers et al. (253) llevan a cabo su estudio en una muestra compuesta únicamente por tumores mamarios, parten de un tamaño muestral inferior al nuestro (N=98) pero incluyen entre los tumores de su estudio estadios T1-T4 y N0-N1. Por lo tanto, su muestra presenta también una alta heterogeneidad, ya que incluye estadios iniciales y avanzados conjuntamente.

Otra de las grandes diferencias de estos dos estudios respecto al nuestro es el tipo de muestra ganglionar utilizada. En el estudio de Joensuu et al. (295), la muestra procedía de punciones (PAAF) de adenopatías palpables en las que una parte de la punción se destinaba al estudio anatomopatológico y otra parte al estudio mediante CMF, pero no existía selección de la muestra, es decir, el reparto muestral para el estudio con ambas técnicas procedía de la misma jeringa de aspiración y, por tanto, de la misma muestra extraída. En el estudio de Leers et al. (253), las muestras provenían de tejido ganglionar incluido en bloques de parafina en el que ya se había realizado el estudio anatomopatológico. Por lo tanto, eran las mismas muestras estudiadas mediante IHQ las que luego se reutilizaban y se trataban para su estudio mediante CMF.

Nuestro estudio formaba parte de un proyecto multidisciplinar para la validación de la técnica de la biopsia del ganglio centinela en nuestro centro. Dado que la técnica *gold standard* era hasta el momento el estudio anatomopatológico mediante inmunohistoquímica (IHQ), el estudio se realizaba en dos fases. En un primer momento se realizaba un estudio anatomopatológico rápido, mediante improntas, mientras la paciente estaba aún en quirófano, para valorar si era necesaria la linfadenectomía axilar en el caso de encontrar afectación ganglionar en ese momento. En caso de que la biopsia rápida intraoperatoria fuera negativa, se realizaba un estudio anatomopatológico diferido con múltiples secciones del ganglio en las que se realizaba tinción con hematoxilina-eosina e inmunohistoquímica. De esa muestra del ganglio centinela restante, una parte era enviada para su estudio al laboratorio de citometría: es decir, en el laboratorio de Citometría no se llegaba a estudiar todo el ganglio, sino el fragmento enviado desde el

laboratorio de Anatomía Patológica, por lo que en algunos casos puede que ese fragmento no contuviese células tumorales que sí estuvieran presentes en el fragmento estudiado mediante IHQ y viceversa.

No obstante, basándonos en el teóricamente elevado nivel de detección de la técnica explorada en este trabajo (establecido en estudios previos realizados en líneas celulares y muestras de sangre periférica de controles y pacientes, en los que se demostró que esta técnica es capaz de detectar células patológicas entre células normales en frecuencias tan bajas como 10^{-7} (221, 222, 246), lo que supera enormemente la sensibilidad de la técnica IHQ convencional), a la elevada especificidad de los marcadores utilizados (CK18 y aneuploidía de ADN), y al hecho de poder analizar en poco tiempo un número muy superior de células que la IHQ (en realidad, toda la muestra disponible), nos propusimos tanto profundizar en el análisis de los resultados discrepantes en nuestro estudio como hacer un análisis crítico de nuestros resultados comparándolos con los publicados en la literatura existente.

Teniendo en cuenta estas premisas, al analizar los 20 casos discrepantes (Tabla 24), y siempre considerando la IHQ como *gold estándar*, observamos que los posibles falsos positivos (N0/CMF+, 15 casos) fueron más numerosos que los falsos negativos (N1/CMF-), que fueron muy escasos (5 casos). Dentro del primer grupo señalamos que, aunque no se puede descartar la existencia de algunos casos verdaderamente falsos positivos, es más lógico interpretar la mayoría de ellos como falsos negativos de la IHQ en función de la mayor sensibilidad de la CMF, teniendo en cuenta dos situaciones: los casos en los que se detectó un porcentaje de células tumorales nada despreciable y difícilmente achacable a un artefacto técnico y la detección, en ganglios centinela, de patrones tumorales muy similares y hasta coincidentes con los detectados en los tumores primarios, ya que en todos los casos antes del análisis del ganglio centinela se estudió el tumor primario para las mismas variables.

Con respecto a los casos que hemos llamado falsos negativos de la citometría, el hecho de que sean pocos (5 casos) apunta a la alta sensibilidad de esta técnica, que queda también reforzada por las bajísimas frecuencias de células detectadas por el método propuesto en este estudio. Aunque de estos 5 casos, en 3 se habían detectado sólo micrometástasis, entendemos que deberían haber sido positivos por CK18/ADN por CMF. La única explicación que hemos encontrado para estos falsos negativos es que la muestra no fuera la misma, es decir, que las dos muestras de ganglio centinela analizadas en los laboratorios de CMF e IHQ no fueran equiparables.

Todo lo anteriormente comentado podría explicar algunos de los resultados discrepantes, que están reflejados en la Tabla 24. Esta tabla está dividida en dos partes,

en función de la discordancia. En la primera parte se analizan los casos que fueron negativos en el estudio anatomopatológico pero positivos mediante el estudio con CMFm (15 casos). En la segunda, los negativos para la IHQ y positivos para la CMFm (5 casos). A su vez, todos ellos se comparan con los resultados en términos de supervivencia, es decir, con la aparición de evento adverso (recaída local y/o metástasis a distancia).

Teniendo esto en cuenta, observamos algunos casos en los que la CMFm detectó infiltración ganglionar en una magnitud que casi no ofrecía lugar a dudas y en los que, además, apareció un evento clínico adverso (metástasis), pero que la IHQ informó como libres de infiltración (casos 66, 113, 181, Tabla 24), así como otros casos en los que la IHQ detectó infiltración ganglionar, pero no la CMFm (casos 99, 169, 182, 190, 192, Tabla 24). Entre estos últimos casos, sin embargo, no hubo ningún evento adverso.

Una explicación posible al primer grupo de casos discordantes (N0/CMF+) podría ser que, siendo la CMFm a priori una técnica más sensible, teniendo en cuenta el gran número de células que estudia, y utilizando además dos marcadores para valorar infiltración (CK18 y ploidía de ADN), la IHQ no haya sido capaz de detectar la afectación ganglionar, dada la mínima infiltración presente. La hipótesis de que los casos N0/CMF+ se interpreten como *falsos negativos de la IHQ* es aceptable en los casos en los que ha aparecido un evento adverso durante el seguimiento (metástasis), ya que es poco probable que el tipo de tumores estudiados (estadios T1, T2) tenga afectación metastásica a distancia si no existe una extensión ganglionar previa. Por lo tanto, la evolución clínica podría ejercer también como factor discriminador en estos casos (casos 66, 113 y 181, Tabla 24). Para la demostración de la naturaleza tumoral de las células consideradas como infiltración metastásica del ganglio habría sido necesario realizar otras pruebas; la citometría de flujo tiene herramientas para llevar a cabo esta comprobación (separación física de estas células para un análisis posterior mediante evaluación morfológica, estudio de alteraciones por técnicas de hibridación in situ, biología molecular, etc.), pero éstas no han formado parte del presente estudio.

Quedan sin aclarar el resto de los casos discordantes, aunque señalamos que los porcentajes de células CK18+ y/o aneuploides detectados por la CMFm han sido $\geq 0.01\%$ en un 67% de los casos (10 y 15), mientras que en los restantes 5 casos han resultado inferiores a 0.01%. Como en estas pacientes no apareció evento adverso, la evolución clínica no nos sirve de factor discriminador. Podría tratarse tanto de falsos positivos de la CMFm como de falsos negativos de la IHQ, pues dada la escasa infiltración detectada por CMFm, ésta podría haberse pasado por alto en el examen IHQ. Es posible asumir que, al menos los casos en los que hemos detectado $\geq 0.01\%$ y un número de células CK18+ >40 y/o han recaído, podrían ser falsos negativos de la IHQ.

Respecto al segundo grupo de casos discordantes (N1/CMF-), teniendo en cuenta que la CMFm analiza un mínimo de 50000 células por estudio, nos parece muy poco probable que la CMFm no pueda detectar infiltración ganglionar si la IHQ es capaz de verla, ya que ésta analiza un número de células muy inferior. Existen varias explicaciones para este hecho. Una de ellas podría estar relacionada con aquellos casos en los que sólo se detectó un clon tumoral diploide en el tumor primario y una ausencia de CK18 en un alto porcentaje de las células tumorales, lo cual sólo sucedió en un caso (caso 192, Tabla 24), lo cual habría hecho más difícil la detección de infiltración tumoral en el ganglio centinela. El caso 192 presentó un solo clon, diploide, y un porcentaje bajo de CK18 en las células tumorales (35%). El resto de los casos tuvieron porcentajes de positividad para CK18 que oscilaron entre el 75 y el 100%, aunque todos ellos carecían de clones aneuploides. Hemos de pensar, por tanto, que el sesgo podría estar más relacionado con que las muestras recibidas en los laboratorios de IHQ y Citometría de flujo fueran diferentes o no equivalentes.

A pesar de que en el momento de la selección de las pacientes la técnica avalada como *gold standard* para el estudio de la enfermedad mínima residual en ganglio centinela era la inmunohistoquímica, debido a la continua progresión que tiene lugar en el ámbito científico, una nueva técnica ha conseguido abrirse camino y colocarse en un lugar preferente para el diagnóstico de afectación metastásica ganglionar en el cáncer de mama inicial: la técnica OSNA (296-299). Metodológicamente, la técnica OSNA es bastante similar al fundamento de la CMFm (300): el marcaje de las células tumorales mediante la CK19 y la identificación cuantitativa de la fluorescencia de las células marcadas, que se asumen como tumorales, ya que las células epiteliales no deben existir en el tejido linfóide ganglionar. La gran ventaja, a nuestro entender, que ha presentado la técnica OSNA para su implantación es la automatización, esto es, el no requerir de personal entrenado o especializado para la interpretación de los resultados, lo que hace que se abaraten los costes y se facilite su manejo (299).

Dadas las grandes similitudes que conceptualmente presenta la técnica OSNA con la CMFm, decidimos revisar cómo se había validado dicha técnica, para compararlo metodológicamente con nuestro estudio. En la mayor parte de los estudios revisados, la técnica OSNA se comparó con el estudio anatomopatológico realizado mediante inmunohistoquímica e improntas con hematoxilina-eosina, como ha sido nuestro caso, y también en gran parte de los casos, antes de la implantación como tal de la técnica, se dividió el ganglio centinela para ser estudiado por ambas técnicas, como hemos hecho nosotros en nuestro estudio. En gran parte de las publicaciones el problema principal que se ha presentado ha tenido que ver con el manejo de la muestra histológica: de hecho, en el apartado de material y métodos de los diversos estudios se muestran diferentes técnicas de muestreo, intentando disminuir los errores debidos a la manipulación de la

muestra (195, 301). A pesar de todas estas precauciones, inherente a este tipo de estudios, existe un sesgo denominado Sesgo de Distribución Tisular (*Tissue Allocation Bias*) (195, 301), que hace referencia a que la implantación de la infiltración metastásica en el ganglio no tiene un patrón fijo, y por tanto, se pueden estar analizando dos secciones del ganglio (una infiltrada y la otra no) que a pesar de tener un mismo origen no sean comparables. Es posible intuir la presencia de dicho sesgo en algunos de los casos, pero dado que no teníamos la posibilidad de comprobación del mismo analizando el resto de la muestra, decidimos no modificarlos y analizarlos igualmente. Sin embargo, es un punto importante a tener en cuenta en el diseño de próximos estudios.

Dado que en la actualidad la técnica OSNA está ampliamente validada y utiliza todo el ganglio centinela, es lógico que su capacidad de detección de células tumorales sea muy elevada. En el momento en que nosotros realizamos este estudio, y dado que se trataba de validar la técnica para el diagnóstico de infiltración tumoral ganglionar, éticamente no se nos permitió utilizar la totalidad del ganglio para su estudio mediante CMFm. Sin embargo, y en vista de las grandes similitudes que presenta esta técnica conceptualmente con la técnica OSNA, es lógico suponer que, si fuera posible el análisis del ganglio centinela en su totalidad, la capacidad diagnóstica de la CMF sería muy similar a la de la técnica OSNA, con la ventaja de que, además, sería posible añadir el estudio de otros factores asociados al ciclo celular, como es la ploidía y la FFS, que aportarían información pronóstica adicional, como veremos en los apartados siguientes. Y aunque la citometría de flujo puede complicarse mucho en base a la complejidad de la respuesta que le exigimos, la realidad es que hoy día la cuantificación de ADN conjuntamente con el marcaje de CK18, es una técnica sencilla, tanto técnicamente como a la hora de interpretar los datos obtenidos. Además, con los citómetros actuales, se pueden adquirir muchas células en muy poco tiempo y se pueden incluir cada vez más parámetros con los que identificar células tumorales.

Finalmente, decidimos evaluar ambas técnicas en términos de superioridad predictiva, es decir, analizando la evolución clínica de las pacientes que formaron parte del estudio y considerando esta evolución clínica como *gold standard*. Así, en un primer paso, comparamos ambas técnicas en los casos en los que tanto la CMF como la IHQ fueron positivas dentro del total de las pacientes, es decir tanto las que sufrieron un evento adverso como las que no lo tuvieron (Figura 21). Como evento adverso se consideraron la recidiva local, las metástasis a distancia y el exitus. La CMF resultó ser positiva en más casos que la IHQ en el grupo de pacientes que presentaron alguno de los eventos adversos, cuando se consideraron en conjunto (RL+MTS+Exitus), lo que puede indicar un mayor poder predictivo de esta técnica frente a la IHQ. Por otro lado, la CMF también fue positiva en más ocasiones que la IHQ en pacientes que no presentaron ningún evento adverso posterior, lo que puede ser atribuible a la alta capacidad de

detección de células tumorales en tejido linfoide de la CMF y al hecho, ya comentado con anterioridad, de que es posible que niveles muy bajos de tumor en el GC puedan no tener capacidad de crecimiento y diseminación, y que, por lo tanto, la detección de células tumorales no se acompañe de evento adverso subsiguiente.

Por último, y dentro de la evaluación de ambas técnicas en términos de superioridad predictiva, valoramos tanto la supervivencia global (SG) como la supervivencia libre de enfermedad (SLE) en las pacientes con infiltración ganglionar valorada mediante CMF o IHQ respecto a las pacientes que no tuvieron afectación ganglionar. La SLE fue mayor en pacientes sin infiltración ganglionar, tanto demostrada mediante CMF como mediante IHQ, y las diferencias alcanzaron significación estadística ($p=0.028$ cuando la infiltración ganglionar se valoró mediante CMFm, $p=0.022$ cuando se estimó mediante IHQ). En el caso de la SG, a pesar de no alcanzarse significación estadística, la tendencia de las curvas es clara: la SG fue menor en las pacientes que presentaron infiltración ganglionar tumoral, tanto valorada mediante CMF como mediante IHQ (Figura 22, Figura 23).

Como conclusión a este tercer punto queremos decir que, a pesar de que la IHQ ha demostrado claramente su utilidad para la detección de infiltración tumoral a nivel del GC, hoy día existen metodologías mucho más sensibles a la hora de buscar enfermedad residual, con un único requerimiento: tener marcadores tumorales fiables. En este estudio hemos utilizado dos marcadores específicos de carcinoma de mama (expresión de CK18 y ploidía de ADN), cuya validez está ya demostrada en la detección de enfermedad residual en tejidos linfoides (221, 222).

En este estudio hemos demostrado que la CMF multiparamétrica es una técnica con alta sensibilidad (93%), superior incluso a la publicada por otros autores (253, 295), con la ventaja añadida de valorar en un mismo tiempo otros factores asociados con el ciclo celular, como son la ploidía de ADN y la FFS, que tienen utilidad pronóstica. También presenta un elevado valor predictivo positivo (81%) y negativo (89%), aunque la especificidad demostrada en nuestro estudio fue ligeramente inferior (74%).

Hemos detectado 15 GC infiltrados por CMFm que fueron negativos por IHQ. No hemos podido demostrar con absoluta certeza que se trate de verdaderos falsos negativos de la IHQ al no haber logrado poner de manifiesto la naturaleza clonal de las células tumorales detectadas en los GC, pero existen datos (expresión de CK18, ploidía y evolución clínica) que apoyan con firmeza esta hipótesis. Aunque la CMFm tiene herramientas para llevar a cabo esta comprobación, estas técnicas no han formado parte del presente estudio.

Nos hemos encontrado con tres limitaciones para poder demostrar la superioridad de la CMFm con respecto a la IHQ convencional: una es la limitación inherente al método estadístico en cuanto al criterio de *gold standard*, otra el no haber podido confirmar la naturaleza tumoral de las células detectadas en los casos positivos por CMFm y una tercera basada en una cuestión de selección muestral, al haberse dividido la muestra entre el laboratorio de Citometría y el de IHQ. De hecho, el análisis detallado de los casos con resultados discordantes sugiere la existencia de una distribución asimétrica de las metástasis a nivel del ganglio centinela, lo que se conoce como Sesgo de Distribución Tisular. Aunque es posible intuir la presencia de dicho sesgo en algunos casos, se decidió analizarlos igualmente ya que no era posible la comprobación del mismo analizando el resto de la muestra. Sin embargo, nos parece un punto importante a tener en cuenta en el diseño de próximos estudios.

Nuestros resultados, por tanto, avalan la CMFm como una técnica útil para valorar la infiltración metastásica a nivel del ganglio centinela en el carcinoma de mama en estadios iniciales. Teniendo en cuenta las características de la CMF multiparamétrica actual, nosotros afirmamos que dicha técnica sería plenamente comparable con la técnica OSNA (296), con la ventaja, además, de poder obtener, en la misma determinación, información sobre otros parámetros que aportan valor pronóstico adicional, como la ploidía de ADN y la porción de células en fase de síntesis o proliferación celular (FFS).

5.4 BÚSQUEDA DE FACTORES CAPACES DE PREDECIR EL POTENCIAL METASTÁSICO DEL TUMOR PRIMARIO EN EL GANGLIO CENTINELA: DATOS BIOLÓGICOS, CLÍNICOS, DE LABORATORIO Y/O PROPORCIONADOS POR LA CMFm. ANÁLISIS UNI Y MULTIVARIANTE.

Desde el inicio del conocimiento del cáncer de mama como enfermedad, se han hecho grandes esfuerzos por identificar qué factores confieren mayor o menor agresividad al tumor y, por tanto, modifican el pronóstico de la misma. Si bien en épocas anteriores a ésta los tumores se diagnosticaban con tamaños muy superiores a los de ahora, en nuestros días, dichos tumores tienen cada vez un tamaño más pequeño. Esto es debido sobre todo al *screening* poblacional mediante mamografías periódicas, que permite un diagnóstico cada vez más precoz de la enfermedad, lo que da lugar a un abordaje en estadios más tempranos (T1, T2) y sin afectación clínica axilar en la mayor parte de las ocasiones (N0) (5, 6).

A pesar de contar a priori con un buen pronóstico, debido a la heterogeneidad intrínseca del cáncer de mama, existe un subgrupo de pacientes con pronóstico desfavorable que desarrollarán metástasis axilares, que en algunos estudios varía entre el 3 y el 25% (302, 303). Sin embargo, dado que la mayor parte de estas pacientes no presentarán metástasis ganglionares, el tratamiento de elección para el estadiaje axilar en este grupo de pacientes es la biopsia selectiva del ganglio centinela (304), que permite por otro lado evitar la linfadenectomía axilar y la morbilidad asociada que ésta conlleva. Algunos autores creen que dentro de este grupo principal de pacientes existe un subgrupo con una probabilidad aún menor de afectación ganglionar (<5-10%), en el que el estadiaje axilar podría omitirse sin que esto tuviera ninguna influencia en el control loco-regional de la enfermedad ni en la supervivencia global (305, 306). Si fuera posible definir con más precisión este grupo de tumores con mínima probabilidad de afectación axilar, podría incluso evitarse el estadiaje axilar, incluso en forma de biopsia selectiva del ganglio centinela, en este grupo de pacientes (307, 308). Por el momento no ha sido posible demostrar qué factor o grupo de factores pronósticos permitiría evitar el abordaje quirúrgico de la axila con total seguridad para el estadiaje de la paciente (309-311), pero dado que el planteamiento tanto del diagnóstico como del tratamiento del cáncer de mama trata de ser cada vez menos agresivo, esta es una línea de investigación a tener en cuenta.

En este trabajo hemos tratado de identificar qué características tumorales patológicas y asociadas al estudio del ciclo celular podrían ayudarnos a conocer los tumores que tienen mayor capacidad de afectación metastásica ganglionar y aquellos

que, por el contrario, se asocian a un menor riesgo de diseminación linfática. Analizamos la relación de la afectación metastásica del ganglio centinela con 11 factores asociados al tumor primario: la edad de las pacientes agrupada por intervalos, el tamaño tumoral, el tipo histológico, el grado histológico, la positividad o negatividad para receptores de estrógenos, progesterona, p53 y Her2-neu, la ploidía, la fracción de la fase S y el porcentaje de CK18 en el tumor primario (Tabla 29). Todas las variables se relacionaron con la afectación del ganglio centinela valorada mediante inmunohistoquímica y Citometría de Flujo, encontrándose una concordancia total entre ambas técnicas: ambas detectaron diferencias estadísticamente significativas en los mismos factores (Tabla 26, Tabla 27).

En el análisis univariante, realizado mediante el test de χ^2 , encontramos tres factores con asociación estadísticamente significativa a la aparición de metástasis en el ganglio centinela: el tamaño tumoral, el tipo histológico y la ploidía (Tabla 26, Tabla 27).

Al realizar análisis multivariante mediante la regresión de Cox (regresión lineal), esta asociación estadísticamente significativa se mantuvo sólo con dos factores: la ploidía y el tamaño tumoral (Tabla 28). En nuestro estudio, por tanto, las variables ploidía y tamaño tumoral demostraron comportarse como **factores de riesgo independientes** para la afectación metastásica del ganglio centinela.

En ambos factores se calculó el exponencial B (también llamado coeficiente β), que hace referencia a la pendiente de la recta estimada mediante la regresión lineal. Este coeficiente expresa estadísticamente cuánto cambia la variable dependiente (la afectación metastásica del ganglio centinela, en nuestro caso) por cada unidad de cambio de la variable independiente (ploidía y tamaño tumoral, en nuestro estudio). En el caso de la ploidía, el exponencial B fue de 2.7, por lo que podemos concluir que en la población de nuestro estudio el riesgo de afectación metastásica del ganglio centinela es 2.7 veces mayor en tumores aneuploides que en los no aneuploides. Para el tamaño tumoral, el exponencial B fue de 2.8 es decir, en las pacientes de nuestro estudio, el riesgo de afectación metastásica del ganglio centinela es 2.8 veces mayor en tumores T2 que en los T1 (Tabla 28).

El tamaño tumoral es un factor ampliamente estudiado y conocido. El hecho de que los tumores de mayor tamaño se asocian a un peor pronóstico es el argumento básico para la implantación generalizada del screening poblacional mediante mamografías periódicas (5, 312, 313). Es un factor tan importante y con tanto peso en sí mismo que forma parte del estadiaje básico de los tumores (15). Ya en 1969 Fisher, en un artículo clásico (62, 314), ponía de manifiesto la relación entre el tamaño tumoral y el pronóstico de la enfermedad. En 1990, la Conferencia de Consenso del Instituto Nacional

de la Salud de Estados Unidos (314, 315) afirmaba que existía una fuerte correlación entre el tamaño tumoral y el riesgo de recurrencia, y que incluso dentro de la categoría T1 existía variación en dicho riesgo: los tumores menores o iguales a un centímetro tendrían un pronóstico particularmente favorable (con una recurrencia menor al 10% a los 10 años) respecto a los tumores de 1.1 a 2 cm de diámetro. En dicha Conferencia se hacía especial hincapié en la importancia de la correcta documentación del tamaño tumoral por parte del anatomopatólogo, de cara a establecer el pronóstico del tumor. El hallazgo de significación estadística en la asociación tamaño tumoral y afectación ganglionar no es, por tanto, un hecho sorprendente, pero nos sirve para demostrar que nuestros resultados están en la línea de las publicaciones internacionales y del conocimiento científico sobre el tema.

Algo parecido ocurre con el tipo histológico. Desde hace tiempo los tumores de mama se han clasificado en grupos y subgrupos asociados con mejor o peor pronóstico. Así, es sabido que existen subtipos histológicos con un pronóstico más favorable, como es el caso de los tumores tubulares, mucinosos o coloides y los subtipos papilares (69, 315). Por el contrario, los subtipos ductales se asocian a peor pronóstico. En nuestros resultados existe una asociación estadísticamente significativa entre el tipo histológico y la afectación metastásica o no del ganglio centinela, valorada tanto mediante IHQ como mediante Citometría de Flujo. Estos hallazgos se corresponden, por tanto, con los de la literatura científica internacional.

Por el contrario, no fuimos capaces de demostrar asociación estadísticamente significativa entre el grado histológico y la afectación metastásica ganglionar, a pesar de ser un parámetro ampliamente estudiado y validado en grandes series y desde hace más de 50 años (247, 316). Este hecho puede estar en relación con el tamaño muestral de nuestro estudio. Dado que la asociación fue casi significativa en el estudio anatomopatológico, es probable que un aumento en el tamaño muestral de nuestro estudio pusiera de manifiesto la relación estadística entre ambas variables ya que, al hacer los subgrupos correspondientes al grado tumoral (I, II y III), dicho tamaño se vio muy disminuido.

En este trabajo valoramos también los parámetros relacionados con el estudio de la cuantificación de ADN por citometría de flujo. En nuestros resultados la ploidía de ADN demostró una asociación estadísticamente significativa con la afectación metastásica del ganglio centinela, esto es: los tumores aneuploides mostraron mayor capacidad para metastatizar en el ganglio centinela que los diploides. Por el contrario, no logramos demostrar asociación estadísticamente significativa entre la afectación metastásica del ganglio centinela y la fracción de la fase S.

La utilización de la citometría de flujo para el estudio de la afectación metastásica ganglionar en tumores en estadios iniciales (T1, T2) no ha sido un procedimiento usual en la literatura científica. Existen, de hecho, pocos estudios que relacionen estos parámetros (ploidía y FFS) con la afectación metastásica en el ganglio centinela y en muchos de ellos los resultados son discordantes. No obstante, es probable que la razón haya que buscarla más en causas estratégicas (como es la escasa implantación de la citometría de flujo en laboratorios de patología de tumores sólidos y/o de anatomía patológica), que relacionadas con la validez de la técnica.

En un trabajo publicado en 1999, Saiz et al. (317) estudiaron 117 tumores en estadios iniciales (T1a) y valoraron ocho parámetros (edad, tipo histológico, grado nuclear, positividad para receptores de estrógenos y progesterona, ploidía, FFS e infiltración linfovascular) para discriminar cuáles de ellos tendrían mayor capacidad metastásica a nivel del ganglio centinela. Sólo encontraron asociación estadísticamente significativa en dos de ellos, el tamaño tumoral y el grado nuclear. En sus conclusiones, afirman que los tumores menores de 0.5 cm tienen una mínima capacidad metastásica a nivel del ganglio centinela y que en tumores de este tamaño y bajo grado nuclear, la cirugía axilar podría ser innecesaria. Del mismo modo, Bader et al. (318), en un estudio llevado a cabo con 358 pacientes con tumores en estadio T1 en el que estudiaron 19 parámetros para valorar la capacidad metastásica del tumor primario, entre ellos la ploidía y la FFS, sólo encontraron significación estadística en cuatro de ellos: la infiltración linfovascular, la elevación del Ki-67 como parámetro de proliferación celular, el tamaño tumoral y el grado histológico. Barth et al. (319), en un estudio retrospectivo en el que se evaluaron 918 pacientes con tumores T1 tampoco encontraron asociación estadísticamente significativa entre ploidía y FFS con la afectación metastásica ganglionar. Por el contrario, esta asociación sí se demostró con otros factores, entre ellos la infiltración linfovascular, el grado nuclear y el tamaño tumoral.

En otros estudios, sin embargo, la asociación entre afectación metastásica ganglionar y los parámetros asociados al estudio del ciclo celular medidos mediante citometría de flujo (ploidía y FFS) sí presenta significación estadística. Chadha et al. (320) estudiaron 263 pacientes con tumores en estadio T1. Valoraron como factores con posible asociación a la afectación metastásica ganglionar siete parámetros: tamaño tumoral, tipo histológico, grado nuclear, ploidía, FFS, positividad para los receptores estrogénicos e infiltración linfovascular. En su estudio, la FFS elevada se asoció con un aumento de la probabilidad de afectación metastásica ganglionar en el análisis univariante, pero sólo el tamaño tumoral y la infiltración linfovascular se comportaron como factores predictores independientes de metástasis ganglionar. Zanon et al. (321) estudiaron 211 pacientes con tumores en estadios iniciales, valorando como factores asociados a la afectación metastásica ganglionar el tamaño tumoral, la positividad para

receptores de estrógenos y progesterona, el grado histológico, el índice de ADN y la FFS. En sus resultados, ninguno de los tumores T1 diploides con baja FFS presentó afectación metastásica ganglionar. En sus conclusiones, los autores afirman que los tumores diploides con tamaño menor de 2 centímetros, bajo grado, positividad para receptores de estrógenos y progesterona y baja FFS podrían formar un subgrupo de tumores con pronóstico más favorable, y que la asociación del índice de ADN, FFS y tamaño tumoral podría ser predictiva del estado ganglionar en este grupo. Mannweiler et al. (322), en un estudio con 341 pacientes, afirmaron que el índice de ADN se relaciona estadísticamente con la afectación ganglionar. Por el contrario, no demostraron asociación estadísticamente significativa entre el estado ganglionar y la FFS, el grado tumoral o la expresión de receptores hormonales. En su estudio concluyen que la asociación de un tamaño tumoral mayor de 2 cm y un índice de ADN >1.44 se relaciona con la presencia de metástasis ganglionares con una especificidad del 100%, una sensibilidad del 89%, un VPN del 91% y un VPP del 100%. Por lo tanto, afirman, la determinación del índice de ADN podría ser un parámetro útil a la hora de predecir el estado ganglionar prequirúrgico de la paciente.

Kallionemi et al. (323) fueron los primeros en utilizar una combinación del valor de la ploidía y la FFS como factor pronóstico en la supervivencia en las pacientes con cáncer de mama. Su grupo consiguió demostrar que los tumores diploides con una FFS baja se asociaban a un pronóstico más favorable, mientras que los tumores aneuploides con FFS elevada se relacionaban con peor pronóstico. Bézcic et al. (278) trataron de buscar factores asociados a la aparición de metástasis ganglionar en un grupo de 112 mujeres con tumores T1a,b. Estudiaron entre otros el tamaño tumoral, el tipo histológico, la invasión linfovascular, la expresión del Her2-neu, la ploidía y valores combinados de ploidía y FFS. La ploidía se asoció a un mayor índice de metástasis ganglionar en el análisis univariante, pero la asociación de ploidía y FFS demostró ser un factor independiente para la aparición de metástasis ganglionares en este grupo de pacientes.

A pesar de que en la Revisión de Consenso sobre la utilidad clínica de la Citometría de Flujo en el Carcinoma de Mama (133) se afirma que el índice de ADN no puede considerarse un factor pronóstico independiente utilizando el análisis estadístico multivariante, existe evidencia de que los tumores aneuploides tienen un pronóstico peor que los diploides (324-327). Por otro lado, el conocimiento básico del ciclo celular y de los mecanismos implicados en la transformación de una célula normal en una célula cancerígena hace factible la hipótesis de que el contenido anormal de ADN celular puede ayudar a discriminar las células enfermas de las sanas dentro de una población dada. Es conocido que una de las principales consecuencias de la transformación tumoral de una célula es su división anárquica, no sujeta a los mecanismos de control habituales en la población celular normal, y la acumulación de errores en el ADN que finalmente dan lugar

a un contenido anormal del mismo en dichas células (328). Por otro lado, cuando más anómalo sea este contenido en ADN podremos inferir que los mecanismos de control celular estarán más afectados y que, por tanto, más agresiva será esta población celular (324-327). De hecho, la aneuploidía y especialmente la presencia de varias poblaciones aneuploides se ha relacionado con la evolución de la enfermedad (252, 281).

La cuantificación del ADN celular mediante CMF multiparamétrica permite identificar poblaciones celulares con diferente contenido en ADN e incluso con diferente expresión de CK18. Así, en los tumores primarios estudiados hemos detectado, con frecuencia, diferentes poblaciones celulares en base a su ploidía y a su expresión de CK18 (Tabla 14). De los 125 tumores estudiados, 61 (49%) mostraron más de un clon tumoral con diferente ploidía. En un 33.6% (42 tumores) se encontraron 2 clones, 3 clones en el 9.6% (12 tumores), 4 en el 2.4% (3 tumores) y 5 clones en el 3.2% (4 tumores). Como ya se ha comentado, esta gran heterogeneidad tumoral está en línea con otras publicaciones (263, 266, 271) aunque en contra de otras (265, 267), si bien estas diferencias estarán basadas, en gran medida, en las estrategias usadas para la detección de aneuploidía, pues clones aneuploides minoritarios o con un índice de ADN (IADN) próximo a 1.00, pueden pasar desapercibidos si el análisis es uniparamétrico o los coeficientes de variación son elevados.

La suma de las dos características tumorales exploradas en este estudio (expresión de CK18 (222) y aneuploidía de ADN (329)) convierten a la citometría en una técnica muy sensible y eficaz para la detección de infiltración ganglionar por células de cáncer de mama.

Dichas células corresponderían a células tumorales migradas a dicho territorio (el ganglio centinela) es decir, metastásicas. Es, por tanto, lógico pensar que los tumores primarios de los que han partido dichas células tendrán una mayor agresividad y capacidad de diseminación que aquellos otros que no presentan metástasis ganglionares.

Nuestros resultados apoyan esta hipótesis, esto es, que en las pacientes con tumores multiploides, una subpoblación de células aneuploides fue la dominante en las metástasis ganglionares, lo que sugiere que la aneuploidía podría ser una propiedad integral de las células metastásicas y que dentro del tumor primario podrían existir subpoblaciones con mayor poder metastásico que otras, como también sugieren otros autores (251, 254).

Otro parámetro que se ha asociado a mal pronóstico en varios tipos de tumor es la proliferación celular de las células tumorales (237, 273, 330). Aunque hay varias formas de medir la proliferación celular, uno de los parámetros más útiles es la fracción de células en fase de síntesis (FFS) (331). La FFS es la medida del porcentaje de células de un

tumor que están en la fase del ciclo celular durante la que se sintetiza el ADN más las que están en mitosis (G2+M). La fracción de fase S se puede usar como un índice de proliferación para brindar una comprensión más completa de la rapidez de crecimiento de un tumor. La Revisión de Consenso sobre la utilidad clínica de la Citometría de Flujo en el Carcinoma de Mama (133) afirma en sus conclusiones que existe una asociación importante entre una FFS elevada y el aumento de recurrencia y mortalidad en pacientes con cáncer de mama. También propone que, dado que la FFS es una variable biológica continua, para optimizar la asignación de las pacientes a grupos de riesgo dicha variable se categorice en terciles, con el fin de disminuir la posibilidad de clasificar erróneamente los tumores con valores de FFS próximos a la normalidad (*borderline*). Del mismo modo, y para facilitar la correcta valoración de la FFS y disminuir en lo posible la contaminación derivada de los desechos celulares, que pueden dificultar la interpretación de los histogramas, anima a utilizar muestras congeladas en vez de muestras incluidas en parafina, que asocian más restos celulares en el momento del análisis. También apunta la utilidad futura de la CMF multiparamétrica, utilizando marcadores específicos para identificar las células tumorales de manera selectiva, y en la que se puedan emplear programas informáticos mejorados que permitan hacer *gates* o ventanas para el análisis específico de poblaciones celulares concretas.

En el presente estudio hemos seguido todas estas recomendaciones (133): hemos utilizado muestras de tejido fresco/congelado, hemos empleado la CK18 para identificar las células epiteliales y diferenciarlas de las células linfoides del ganglio centinela, hemos seguido un proceso de lectura a baja velocidad que minimiza la formación de turbulencias. Asimismo, hemos analizado las muestras en diagramas de dos parámetros, mucho más precisos a la hora de calcular la proliferación celular tumoral de cada población celular identificada en base a su ploidía y a su expresión de CK18 y hemos estudiado un alto número de células (entre 5×10^4 y 10^7 células). Desde el punto de vista estadístico, también hemos seguido la recomendación de transformar la variable cuantitativa continua FFS en una variable categórica utilizando los terciles (Tabla 16, Tabla 17).

A pesar de todo ello, no hemos podido encontrar asociación estadísticamente significativa entre la afectación metastásica a nivel del ganglio centinela y la elevación de la FFS. Dada la gran disparidad de resultados existentes en la literatura internacional, nuestros resultados son concordantes con algunos (317, 319) y discordantes con otros (321, 322, 332).

En nuestro estudio la FFS se relacionó de forma estadísticamente significativa con la ploidía, es decir, los tumores aneuploides demostraron tener una FFS más elevada que los diploides (Tabla 17, Tabla 18). Este es un hecho que está ampliamente avalado en

la literatura internacional (333-336). Nuestros resultados son, por tanto, concordantes con la misma.

Teniendo en cuenta esta asociación, nos planteamos buscar la utilidad de estos dos parámetros conjuntamente para establecer grupos pronósticos. Este aspecto lo revisaremos en el último punto de esta discusión.

Como conclusión a este cuarto punto, podríamos decir que en este estudio demostramos que el tamaño tumoral, el grado histológico y la ploidía de ADN se asocian de manera estadísticamente significativa con la aparición de metástasis a nivel del ganglio centinela. Por tanto, en nuestro grupo de pacientes, los tumores de mayor tamaño, mayor grado tumoral y aneuploidía de ADN en alguno de los clones tumorales se comportan de manera más agresiva que aquellos tumores más pequeños, de bajo grado y con ADN diploide en todas las líneas celulares tumorales y tendrían, en consecuencia, peor pronóstico.

Al realizar análisis multivariante mediante la regresión de Cox, las variables ploidía y tamaño tumoral demostraron comportarse como **factores de riesgo independientes** para la afectación metastásica del ganglio centinela, con un exponencial B de 2.7 en el caso de la ploidía y de 2.8 para el tamaño tumoral, por lo que podemos concluir que en la población de nuestro estudio el riesgo de afectación metastásica del ganglio centinela es 2.7 veces mayor en tumores aneuploides que en los no aneuploides y 2.8 veces mayor en tumores T2 que en los T1.

A pesar de no encontrar asociación estadísticamente significativa entre la FFS y la afectación metastásica del ganglio centinela, en nuestro estudio la FFS se relaciona de manera estadísticamente significativa con la ploidía, es decir, los tumores aneuploides tienen una FFS más elevada que los diploides.

5.5 ESTUDIO DE LA CORRESPONDENCIA ENTRE LAS CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS Y/O FACTORES PRONÓSTICOS EN EL TUMOR PRIMARIO Y LAS VARIABLES RELACIONADAS CON EL ESTUDIO DEL CICLO CELULAR, VALORADAS MEDIANTE CMF (FFS, PLOIDÍA).

Teniendo en cuenta que, como ya se ha comentado, el cáncer de mama es el tumor maligno más frecuente en las mujeres, al representar aproximadamente el 30% del total de cánceres diagnosticados en el sexo femenino, y que en la actualidad casi el 18% de las muertes por cáncer en mujeres se encuentran relacionadas con esta patología, se han hecho grandes esfuerzos por intentar establecer qué factores pronósticos pueden predecir una evolución más favorable o más agresiva dentro de este tipo de tumores. Este es uno de los fundamentos del sistema de estadiaje TNM, ya que desde los primeros estudios relativos al pronóstico de la enfermedad, el estadio clínico y las características histopatológicas han sido los factores más determinantes a la hora de asignar un mejor o peor pronóstico a la misma. Sin embargo, estos sólo representan aspectos estáticos de la enfermedad neoplásica. Con el paso del tiempo, el mejor conocimiento de la misma ha puesto en evidencia la relevancia de otros factores asociados a características tumorales que pueden valorar mejor el pronóstico bien porque su presencia se asocia a características de menor malignidad o agresividad, como es el caso de los receptores de estrógenos y de la proteína p53, o bien porque su existencia puede hacer más sensible al tumor a terapias diana o específicamente dirigidas contra las células malignas, como ocurre con el oncogen Her2-neu (64).

En los últimos años, los marcadores relacionados con la proliferación celular han cobrado una gran relevancia, y han sido muchos los intentos de conseguir un marcador ideal que nos permita identificar aquellos tumores con mayor capacidad de división celular y, por tanto, más agresivos, pero probablemente también por ello más sensibles a los agentes quimioterápicos usados en el tratamiento del cáncer. Así, han surgido múltiples marcadores en esta línea: Ki67, Ciclina-D, Ciclina-E, p27, p21, timidina kinasa y topoisomerasa II, entre otros (64). Sin embargo, ninguno de ellos ha conseguido tener la suficiente relevancia clínica como para ser recomendado de forma rutinaria en el estudio del tumor, según las últimas recomendaciones de la ASCO (110).

El análisis del ADN mediante citometría de flujo ha abierto otra puerta al conocimiento del comportamiento tumoral, permitiéndonos obtener información sobre aspectos dinámicos de la enfermedad que tienen que ver con la cinética celular y los cambios en la ploidía del ADN de las células tumorales. A pesar de que las recomendaciones de la ASCO del 2007 (110) tampoco recomiendan el uso de la ploidía del ADN y de la FFS en el estudio rutinario del tumor, existen múltiples estudios que

relacionan ambos parámetros con un peor pronóstico en pacientes no tratadas, así como también podrían predecir qué pacientes podrían beneficiarse del tratamiento quimioterápico en algunas circunstancias (337). Una de las principales trabas que pone la ASCO para la validación de los parámetros asociados a la CMF (ploidía y FFS) como marcadores rutinarios de proliferación celular es la gran variabilidad de métodos tanto en la preparación tisular como en la instrumentación y en la manera de medir, interpretar y valorar las imágenes (histogramas, dot-plots) para estimar la FFS publicados en la literatura internacional. Por otro lado, existen muchos estudios aislados, pero con un número de pacientes pequeño, con poblaciones heterogéneas y en la que la extrapolación de resultados es difícil. A pesar de ello, en sus conclusiones afirman que, aunque los datos existentes en la actualidad no tienen la consistencia suficiente para recomendar el uso rutinario de la citometría a la hora de tomar decisiones clínicas, si la FFS se ha determinado utilizando un método validado y en un laboratorio con experiencia, la elevación de la FFS se ha asociado con un peor pronóstico (336, 338-342). Como ya se ha comentado en varios lugares de este trabajo, el análisis en una sola determinación de la ploidía, la expresión de CK18 y la FFS permite una estimación bastante precisa de la proliferación celular. Este es uno de los valores añadidos de este estudio y uno de los objetivos de esta tesis era, por ello, evaluar el valor pronóstico de todos los parámetros evaluados.

Para tratar de conocer mejor las implicaciones pronósticas de los parámetros estudiados mediante la CMF (la ploidía y la FFS de las células tumorales identificadas por su expresión para CK18), muchos estudios han intentado relacionarlos con otros marcadores clásicos de la enfermedad, como son el tamaño, el grado histológico, el tipo histológico y la afectación metastásica ganglionar. En otros estudios se ha estudiado también la relación entre estos parámetros y la presencia o no de receptores hormonales, p53 y Her2-neu, tratando de encontrar una correspondencia entre ellos (343, 344).

En nuestro estudio, hemos relacionado la ploidía del ADN y la FFS del tumor primario con características clínicas y biológicas de dicho tumor, y hemos tratado de ver la correspondencia en términos de significación estadística, de dichas variables entre sí. Estas características fueron: edad de las pacientes, tipo histológico tumoral, grado histológico, tamaño tumoral, estado ganglionar, positividad para receptores de estrógeno y progesterona, p53, Her2-neu, clasificación molecular, aparición de recidiva local y aparición de metástasis a distancia. También buscamos la relación de la FFS y la ploidía entre sí (Tabla 30).

Nuestros resultados son, mayoritariamente, concordantes con los resultados publicados en la literatura internacional. Así, nosotros encontramos una relación

estadísticamente significativa entre la ploidía y la FFS ($p < 0.001$), tanto si utilizamos la mediana como punto de corte para la FFS como si la estratificamos en terciles (FFS alta, media y baja): los tumores aneuploides se asociaron con FFS más elevada que los diploides. En nuestra población, la mediana de la FFS en los tumores aneuploides fue de 12.60% frente al 5.40% de los tumores diploides, es decir, más del doble (Tabla 17). Al estratificar la FFS en terciles, en todos ellos se mantuvo una relación de prácticamente el doble en tumores aneuploides frente a diploides (p33: 10.0% frente a 4.01%; p66: 15.04% frente a 6.5%; p99: 42% frente a 24.3%) (Tabla 17). Hagbin et al. (345) también encontraron una relación estadísticamente significativa entre la ploidía del ADN tumoral y la FFS ($p < 0.0001$), así como un porcentaje de FFS muy superior en tumores aneuploides (mediana=9.9%) frente a diploides (mediana=4.5%). Por su parte, Pinto et al. (341) refieren una asociación estadísticamente significativa entre estos dos parámetros ($p < 0.001$). En su estudio reflejan también un porcentaje de FFS muy superior en tumores aneuploides (mediana=12.0%) frente a diploides (mediana=3.8%). Del mismo modo, Gazic et al. (346), en un estudio prospectivo llevado a cabo con 770 pacientes utilizando muestras de tejido fresco congelado, demuestran una asociación estadísticamente significativa entre la ploidía y la FFS tumoral, al igual que Michels et al. (347), Stal et al. (348-350) y Chavez-Urbe et al. (351).

Existe gran controversia en la literatura respecto a la asociación de los parámetros relacionados con el ciclo celular valorados mediante CMF (ploidía y FFS) y el resto de parámetros clínicos y anatomopatológicos que han demostrado tener valor pronóstico en el manejo del cáncer de mama.

Las alteraciones en la ploidía del ADN se han asociado clásicamente con tumores de mayor tamaño y ausencia de receptores para estrógenos (132, 341, 345, 352, 353), aunque existen publicaciones en las que los autores no consiguen demostrar asociación estadística entre ploidía y tamaño tumoral (127) ni entre ploidía y ausencia de receptores estrogénicos (354, 355). Algunos estudios también relacionan las alteraciones del ADN del tumor primario con tumores de alto grado histológico y afectación metastásica ganglionar (336, 341, 346, 351) aunque, como ocurría en el apartado anterior, otros estudios no demuestran tal asociación (354, 356, 357). La relación entre la ploidía del ADN y la edad de las pacientes ha sido estudiada en múltiples publicaciones, con resultados también contradictorios: algunos autores afirman que el porcentaje de tumores aneuploides es mayor entre la población de mujeres mayores de 50 años (335, 358), mientras otros afirman lo contrario, es decir, que no existe relación entre la edad de la paciente y el contenido en ADN del tumor primario (127, 359).

La elevación de la FFS se ha relacionado con tumores de alto grado histológico y, por lo tanto, peor pronóstico (131, 341, 345, 353). De hecho, conceptualmente la FFS y el

grado histológico están muy relacionados, ya que ambos son reflejo de la capacidad de división celular y, por tanto, de la proliferación. Por este motivo, la Revisión de Consenso sobre la utilidad clínica de la Citometría de Flujo en el Cáncer de mama llevada a cabo en 1993 (131) propone la utilización de la FFS como parámetro de apoyo a la clasificación del grado histológico, dada la subjetividad implícita en la valoración de éste. A pesar de las diversas técnicas y puntos de corte utilizados para su valoración la correlación entre la FFS y el resto de marcadores pronóstico en el cáncer de mama es bastante consistente en la literatura internacional. Además de la mencionada asociación con el grado histológico, la mayor parte de los estudios demuestran asociación entre la FFS elevada y el tamaño tumoral (276, 341, 345, 360, 361), la ausencia de receptores para estrógenos (273, 341, 345, 362) y la afectación metastásica de los ganglios axilares (336, 347, 363-365). No obstante, y al igual que ocurre en el caso de la ploidía, existen también artículos cuyos resultados contradicen lo anteriormente expuesto. Así, algunos autores afirman que no existe relación entre la FFS y el tamaño tumoral (366), la ausencia de receptores estrogénicos (273, 366) o la afectación ganglionar axilar (273, 366, 367). A pesar de que la mayor parte de los estudios no han encontrado una relación consistente entre la FFS y la edad de las pacientes (273, 341, 345, 368), en otros casos sí se ha demostrado una asociación entre ellas (336, 347, 361, 369).

Nuestros resultados son concordantes con los datos publicados por la mayor parte de los autores. Nosotros sí hemos encontrado asociación estadísticamente significativa entre la ploidía y el grado tumoral ($p=0.001$), de manera que los tumores de más alto grado ($n=44$) fueron mayoritariamente aneuploides (33 aneuploides frente a 11 diploides), mientras que la mayor parte de los tumores de bajo grado ($n=16$) fueron diploides (12 diploides frente a 4 aneuploides) (Tabla 30).

También encontramos una asociación estadísticamente significativa entre el tamaño tumoral y la ploidía ($p=0.013$), es decir, los tumores de mayor tamaño ($n=72$) fueron en su mayoría aneuploides (46 aneuploides frente a 26 diploides), mientras que los tumores más pequeños ($n=53$) fueron diploides en su mayor parte (31 diploides frente a 22 aneuploides). No conseguimos demostrar, sin embargo, asociación estadísticamente significativa entre la FFS y el tamaño tumoral ($p=0.467$), al igual que otros autores ya mencionados anteriormente (366) (Tabla 30).

Respecto a la relación entre ploidía y FFS con la afectación metastásica ganglionar, encontramos asociación estadísticamente significativa entre ésta y la ploidía ($p=0.001$), pero no con la FFS ($p=0.173$) (Tabla 30). Dada la gran disparidad de resultados existentes en la literatura internacional, nuestros resultados pueden ser avalados por la misma. El hecho de que la aneuploidía pueda estar relacionada con una mayor probabilidad de metástasis ganglionar es, a priori, una hipótesis plausible, como así lo

demuestran gran cantidad de estudios (336, 341, 346, 351), es decir, los tumores cuyas células muestran alteraciones en el contenido del ADN suelen ser tumores más agresivos, cuyos mecanismos de control celular están alterados, y por tanto, con más posibilidades de afectación tumoral a distancia. Esta misma explicación podría aplicarse a la FFS: sin embargo, en nuestro caso esta afirmación no se cumple. Uno de los motivos por los que podría explicarse la gran discordancia existente entre los distintos estudios entre sí con respecto a la FFS tiene que ver con la gran disparidad de métodos utilizados para valorarla (331). En nuestro estudio, hemos utilizado muestras de tejido fresco congelado, siguiendo las recomendaciones de la Revisión de Consenso sobre la utilidad clínica de la Citometría de Flujo en el Cáncer de mama (131), para disminuir en lo posible los artefactos generados por los restos celulares en la muestra. También hemos utilizado la citometría de flujo multiparamétrica, mediante la tinción con la CK18 para identificar de forma individualizada las células tumorales respecto a las no tumorales, y hemos manejado un programa informático (Paint Gate Pro) que permite hacer una selección precisa de las células tumorales, con lo que se obtiene un cálculo bastante fiable de la FFS. La gran complejidad del tumor en cuanto a diferentes poblaciones de distinta ploidía dificulta el cálculo preciso de la fase de síntesis, por lo que se hace necesario el uso de la citometría multiparamétrica (CK18/IP) para calcular la proliferación celular de cada clon de forma individualizada. En concreto, en nuestra serie sólo en tres de los 125 casos, nos fue imposible realizar el cálculo de la proliferación (porcentaje de células en fase de síntesis) debido a la superposición de los diferentes picos aneuploides. Teniendo todo esto en cuenta, no tenemos duda de que nuestra metodología ha sido correcta, y de que, por tanto, nuestros resultados pueden ser comparables a los de otros grupos de estudio ya mencionados previamente (273, 366, 367).

Nuestros resultados también apoyan la relación entre ploidía y FFS con la presencia de receptores estrogénicos ($p=0.022$ y $p=0.000$, respectivamente) (Tabla 30). Estos datos también están en consonancia con los resultados mostrados en la literatura internacional, y llevan implícita la asociación de la presencia de receptores estrogénicos en el tumor con mejor pronóstico. De hecho, en nuestra serie, los tumores aneuploides y con FFS elevada se asociaron a ausencia de receptores estrogénicos en las células tumorales. Aunque la presencia de receptores para progesterona suele estar asociada a la presencia de receptores de estrógenos, en nuestro caso esta asociación sólo se cumple con la FFS ($p=0.006$) pero no con la ploidía ($p=0.235$). Stal et al. (349) también encontraron resultados similares.

Existen muy pocos artículos en la literatura que comparen o relacionen específicamente la asociación entre FFS y ploidía con el p53 y el Her2-neu. Sin embargo, nos ha parecido interesante su estudio, ya que ambos son marcadores asociados a la

enfermedad y que cada vez están cobrando más importancia, cada uno por motivos diferentes.

Como ya se ha comentado en la introducción, el gen p53 es un gen supresor tumoral localizado en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13), que codifica una fosfoproteína nuclear de 393 aminoácidos que desempeña un papel importante en control del ciclo celular, como mediadora de la diferenciación, de la reparación del ADN y de la apoptosis. Este gen se activa cuando la célula sufre daños en su ADN o cuando recibe estrés celular, codificando una proteína (p53), cuya actividad resulta esencial para inducir la respuesta de la célula ante el daño del ADN, deteniendo el ciclo celular en caso de mutación, para prevenir la replicación del ADN dañado, como activando la apoptosis celular para eliminar células defectuosas. Un p53 alterado podría permitir que las células anormales proliferen, originando así una línea celular anómala que terminase produciendo un tumor. En células normales, el nivel de la proteína p53 es bajo porque se encuentra asociada a un ligando, Mdm2. Los daños del ADN y otras señales de estrés pueden hacer que p53 no se una a Mdm2 e incrementar su concentración (370, 371). A pesar de que las recomendaciones de la ASCO del 2007 (110) no aconsejan la utilización de forma rutinaria del p53 en el manejo clínico de las pacientes con cáncer de mama, existe cada vez evidencia más consistente de que los niveles elevados de p53 se asocian a mal pronóstico de la enfermedad (372-376).

Por su parte, el Her2-neu, conocido también como c-Erb2, es un protooncogén localizado en el brazo grande del cromosoma 17 (17q21.1) que codifica una glicoproteína con actividad tirosina quinasa en su dominio intracitosólico que comparte gran similitud con el receptor del factor de tipo epidérmico humano. Es clave para el crecimiento y la división normal de las células, por lo que su expresión anormal está vinculada a procesos cancerosos. El Her2-neu se sobreexpresa en aproximadamente 25-30% de las pacientes con cáncer de mama y está asociado a una incrementada actividad biológica del tumor, es decir, una tasa de división acelerada por mayor respuesta de la célula a los niveles normales de factores de crecimiento. Generalmente es indicativo de una evolución desfavorable del cáncer de mama: las pacientes con cáncer de mama que presentan amplificación de Her2-neu presentan generalmente una forma más agresiva de cáncer, además de una mayor resistencia a tratamientos convencionales. Sin embargo, son pacientes que responden mejor al tratamiento combinado de quimioterapia con trastuzumab, un anticuerpo monoclonal humanizado que se dirige contra el dominio extracelular del receptor Her2-neu, aumentando la tasa de supervivencia de las pacientes. Por este motivo, el Her2-neu se ha convertido en un importante marcador y diana de tratamiento oncogénico, especialmente del cáncer de mama (377-380).

Al comparar ploidía y FFS con p53, encontramos una asociación estadísticamente significativa entre ambos parámetros ($p=0.024$ y $p=0.002$, respectivamente) (Tabla 30). El hecho de que el oncogén p53 esté íntimamente relacionado con los procesos de reparación del ADN celular en las células tumorales hace que sea comprensible la asociación entre esta variable y tanto la ploidía como la FFS. En el caso del Her2-neu, sin embargo, sólo pudimos demostrar asociación estadísticamente significativa entre éste y la FFS ($p=0.016$), mientras que la relación con la ploidía no fue significativa ($p=0.115$) (Tabla 30).

Como conclusión a este quinto punto podríamos decir que en este estudio hemos observado una buena correlación entre los factores pronósticos clásicos (como son el grado histológico, el tamaño tumoral, la infiltración tumoral ganglionar y la positividad para receptores de estrógenos y progesterona) y los relacionados con el estudio del ciclo celular (ploidía de ADN y FFS), y que nuestros resultados son mayoritariamente concordantes con los encontrados en la literatura internacional.

También hemos encontrado una asociación estadísticamente significativa con otros factores pronósticos adicionales, como son el p53 y el Her2-neu, cuya relación con la ploidía y la FFS está menos estudiada en las publicaciones existentes.

5.6 ESTUDIO DE LA SUPERVIVENCIA GLOBAL Y LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD EN FUNCIÓN DE LOS FACTORES PRONÓSTICOS PRESENTES EN EL TUMOR PRIMARIO Y LAS VARIABLES RELACIONADAS CON EL ESTUDIO DEL CICLO CELULAR, VALORADAS MEDIANTE CMFM (PLOIDÍA Y FFS). PROPUESTA DE CREACIÓN DE GRUPOS PRONÓSTICO.

El estudio del cáncer de mama como enfermedad global, es decir, no sólo limitada a la glándula mamaria, sino teniendo en cuenta la afectación sistémica que termina produciendo en muchas ocasiones, ha experimentado un auge inmenso en los últimos veinte años. Uno de los campos que se ha investigado con más interés es el que hace referencia al conocimiento de los factores pronósticos y predictivos que pueden orientarnos a qué tipo de tumores experimentarán un desarrollo más rápido, más agresivo o tendrán una mayor sensibilidad a los tratamientos quimioterápicos. En definitiva, los esfuerzos diagnósticos y terapéuticos en lo que se refiere a la enfermedad van todos encaminados a mejorar la supervivencia, tanto en términos de supervivencia libre de enfermedad (definida como el intervalo entre la intervención quirúrgica y la Aparición de la primera recurrencia local o metástasis a distancia) como de supervivencia global (definida como el intervalo de tiempo transcurrido entre la intervención quirúrgica inicial y el tiempo final del seguimiento, es decir, entre la intervención quirúrgica y la última observación clínica o el exitus debido al cáncer de mama).

La estimación y el estudio de la supervivencia en las enfermas con cáncer es un tema complicado, ya que entran en juego múltiples factores, desde el estado general previo de la paciente hasta los tratamientos administrados anterior o posteriormente al tratamiento quirúrgico, así como el propio tratamiento quirúrgico recibido.

El grupo de pacientes que formaron parte de este trabajo fue seleccionado en base a las características tumorales, ya que formaban parte de un protocolo de estudio multidisciplinar para la implantación en el Hospital Universitario de Salamanca de la técnica de la biopsia selectiva del ganglio centinela: tumores en estadios iniciales, de pequeño tamaño (T1, T2) y sin afectación clínica axilar en el momento del diagnóstico (N0). Teniendo en cuenta estas características, la mayor parte de las pacientes fue sometida a cirugía conservadora, que requirió ampliación a mastectomía en algunas situaciones en función de los resultados de la anatomía patológica. Por este mismo motivo, ninguna de las pacientes recibió quimioterapia neoadyuvante, por lo que esta variable no puede actuar como factor de confusión en nuestro estudio. Sin embargo, posteriormente al tratamiento quirúrgico, prácticamente todas recibieron quimio, radio

y/o hormonoterapia, dependiendo del caso. Esta última variable, es decir, el tratamiento adyuvante administrado podría modificar los resultados globales de la supervivencia, ya que está demostrado (y es, por tanto, una de las razones para su administración) que la radioterapia disminuye la recaída local en las pacientes sometidas a cirugía mamaria conservadora y que tanto la quimioterapia como la hormonoterapia mejoran los resultados en cuanto a la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad en estas pacientes (138, 162, 381-384).

Si bien estos datos podrían, como se ha comentado, actuar como factores de confusión, la mayor parte de los estudios que analizan la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global en términos de factores pronósticos, no tienen en cuenta los tratamientos adyuvantes para su estudio, asumiendo que éstos mejorarían globalmente y por igual la supervivencia en todos los grupos, y por tanto el factor pronóstico sería el discriminante a la hora de valorar diferencias. Debido a que excede las competencias del presente trabajo, nosotros no hemos considerado la influencia de los distintos tipos de tratamiento quirúrgico y adyuvante administrados a nuestras pacientes, y hemos valorado la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad teniendo en cuenta los distintos factores pronósticos estudiados, viendo la mayor o menor influencia de cada uno de ellos en el resultado final.

El seguimiento de las pacientes para la estimación de la supervivencia comenzó en el momento en que se llevó a cabo la intervención quirúrgica. En total, el tiempo máximo de seguimiento fue de 149.16 meses (12.4 años) (Tabla 11). La supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad se estimaron en dos puntos de corte, a los 5 y 10 años. En este grupo de pacientes la SG a los 5 años fue del 92.9%, y a los 10 años del 88.3%. Por su parte, SLE a los 5 años fue del 86.8% y a los 10 años del 74.8%. Estos datos son concordantes con los ofrecidos por la base de datos del SEER del Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos, obtenidos en población norteamericana: su estimación para la supervivencia global en estadio II es del 93% a los 5 años (385). Otro estudio llevado a cabo en Granada, con población española, en el año 2010 presenta una estimación de la supervivencia global ligeramente inferior a la nuestra: 85,7% y del 71,4% a los 5 y 10 años para el estadio I y del 86,2% a los 5 años y del 77,6% a los 10 años para el estadio II (386).

En este estudio valoramos la relación entre las variables asociadas al ciclo celular estimadas mediante la CMFm (ploidía y FFS) con la aparición de recaída local y metástasis a distancia. Sólo encontramos asociación estadísticamente significativa entre la ploidía y la aparición de metástasis ($p=0.015$) (Tabla 30).

También decidimos comparar los factores pronósticos clásicos con la evolución de las pacientes, en términos de SG y SLE. Así, establecimos comparaciones con la edad, el tipo histológico, el grado histológico, el tamaño tumoral, el estado ganglionar valorado mediante IHQ y CMF, la presencia de RE/RP, p53 y Her2-neu (Tabla 31, Tabla 32). En este sentido, tan sólo el p53 se asoció de manera estadísticamente significativa con la supervivencia global ($p < 0.001$) (Figura 29), mientras que ninguno del resto de los parámetros expuestos lo hizo (Tabla 32). Sin embargo, sí encontramos diferencias estadísticamente significativas al asociar algunos de estos parámetros con la supervivencia libre de enfermedad. Una SLE menor se asoció a un mayor tamaño tumoral ($p = 0.027$) (Figura 26), un mayor grado histológico ($p = 0.037$) (Figura 25), afectación ganglionar metastásica -tanto estimada mediante IHQ ($p = 0.046$) (Figura 27) como mediante CMF ($p = 0.048$) (Figura 28)- y positividad para p53 ($p = 0.021$) (Figura 29). No se encontró asociación estadísticamente significativa entre la SLE y la edad, el tipo histológico, la positividad para RE/RP o la expresión de Her2-neu (Tabla 31).

Estos hallazgos son, cuando menos, sorprendentes, ya que algunos de ellos son parámetros clásicos plenamente establecidos como factores pronósticos y asociados tanto a la SG como a la SLE en la mayor parte de los estudios revisados (346, 369, 387-389). Una de las razones que se nos ocurren para justificar estos resultados tiene que ver con la selección de la muestra: dado que la muestra de tumores de este estudio fue seleccionada en base a algunos de esos factores pronósticos (tamaño pequeño, no afectación ganglionar clínica inicial), esta misma selección podría estar sesgando la capacidad pronóstica de este grupo de factores, es decir, partimos de una población seleccionada, de tumores con estadios iniciales y, por tanto, con buen pronóstico a priori, ya que se han tratado de evitar algunos de los factores de mal pronóstico (tamaño tumoral grande, afectación ganglionar axilar metastásica) desde el inicio. Por otro lado, teniendo en cuenta que en este estudio la SG a los 5 años fue del 92.9% y a los 10 años del 88.3% y que, por tanto, la probabilidad de aparición de efectos adversos es baja, probablemente necesitaríamos un tamaño muestral mayor para poder poner de manifiesto la influencia de estos factores.

Al comparar los parámetros obtenidos con la determinación de cuantificación de ADN mediante CMF (ploidía del ADN y FFS) tanto con la SG como con la SLE, observamos que la ploidía se asoció de manera estadísticamente significativa con la SLE ($p = 0.023$), pero no con la SG (Figura 30). La FFS, sin embargo, no demostró tener asociación estadísticamente significativa con la SLE, pero sí con la SG ($p = 0.036$) (Figura 31, Tabla 31, Tabla 32).

Existen múltiples estudios en los que se ha estudiado la relación entre la supervivencia global y la SLE con la ploidía y la FFS. A pesar de que conceptualmente es

lógico pensar que los tumores aneuploides y con un porcentaje de FFS más elevado serán más agresivos y tendrán, por tanto, una menor supervivencia, en la revisión de la literatura existen discrepancias en los resultados. Así, Cornelisse et al. (390), en un estudio con 565 pacientes a las que siguieron durante más de 10 años, encontraron que la ploidía del ADN era un factor pronóstico adverso independiente. Su estudio, a pesar del largo seguimiento y del gran número de pacientes, está llevado a cabo con muestras tanto de tejido fresco congelado como incluido en parafina y con tumores más evolucionados (incluye tumores en estadio IV). Sin embargo Stal et al. (361), en una serie de 219 tumores muy similares a los nuestros (T1N0), afirman que la ploidía no fue un factor pronóstico independiente, pero sí la FFS tanto en SG como en SLE, y concluyen que la FFS tiene significado pronóstico en el cáncer de mama en estadio I. Del mismo modo, Gazic et al. (346), en un estudio con 770 pacientes utilizando muestras de tejido fresco congelado, afirman que la FFS, el grado histológico, la afectación metastásica de los ganglios axilares, el tipo histológico y el tamaño tumoral son factores pronósticos independientes tanto con la SG como con la SLE. La ploidía sólo mostró significación estadística en el análisis univariante, pero no en el multivariante. Bracko et al. (391), por su parte, en un estudio con 303 pacientes y utilizando muestras de tejido fresco congelado, afirman que tanto la ploidía como el grado histológico y la afectación metastásica de los ganglios axilares son factores pronósticos independientes tanto para la SG como para la SLE. Duigou et al. (369) estudian 1485 pacientes y sostienen que tanto la FFS como la ploidía son factores pronósticos independientes tanto para la SG como para la SLE. Algunos autores (273, 276, 341, 345) encuentran que la FFS pero no la ploidía es un factor pronóstico independiente para la SG y la SLE. Otros autores, por el contrario, encuentran que la ploidía y no la FFS demuestra ser factor pronóstico independiente para la SG (240, 335, 351) o para la SG y la SLE (392, 393). Por el contrario, hay autores que afirman que no existe relación pronóstica entre la ploidía y la FFS tanto con la SG y la SLE (394-397).

Gran parte de la heterogeneidad en los resultados publicados se debe, entre otros factores, a la diferente selección de la muestra (tumores en diferentes estadios y, por tanto, con diferentes implicaciones pronósticas), a las diversas maneras de procesar dicha muestra (análisis en parafina o en tejido fresco congelado) y a la diferente manera de valorar y analizar los resultados, así como a la diversidad de puntos de corte usados como discriminadores de niveles de proliferación.

Nuestra muestra, sin embargo, fue muy homogénea: estaba formada por tumores en estadios iniciales (T1, T2, N0), se siguieron todas las recomendaciones de la Revisión de Consenso sobre la utilidad clínica de la Citometría de Flujo en el Cáncer de mama de 1993 (131) (tejido fresco, valoración de la FFS en terciles) y se utilizó la CMF multiparamétrica con marcaje celular mediante la CK 18. Teniendo en cuenta que quizás

por esa selección tan exhaustiva de las pacientes el grupo de tumores pudiera reunir unas características de buen pronóstico *per sé* que enmascarasen o hicieran difícil valorar la influencia como tales de los factores pronósticos a estudiar, decidimos estratificar dichos tumores en función de la ploidía y analizar así de forma separada la influencia de la FFS en tumores diploides y aneuploides, y su relación con la SG y la SLE. Este hecho nos permitió observar que dentro del grupo de los tumores diploides, aquellos con FFS elevada se asociaron a una disminución tanto de la SG ($p=0.0014$) como de la SLE ($p=0.006$) (Figura 33). En el grupo de tumores aneuploides la tendencia de las curvas también sugiere un resultado similar, aunque no conseguimos demostrar asociación estadísticamente significativa entre los diferentes valores de la FFS y la SG o la SLE (Figura 34).

Este resultado nos parece relevante: se trata de la posibilidad de detectar un subgrupo de pacientes con peor pronóstico dentro del grupo de pacientes con presumible mejor pronóstico (tumores diploides), es decir, un subgrupo relacionado con un curso más agresivo de la enfermedad que podría beneficiarse de un enfoque terapéutico diferente.

El hecho de intentar encontrar subgrupos poblacionales de pacientes con tumores con comportamientos biológicos diferentes respecto al conjunto global de la población ha sido y es una de las metas de la oncología actual, encaminada a ofrecer terapias individualizadas que permitan optimizar los resultados terapéuticos disminuyendo al máximo los efectos adversos. Desde que en los años 60 Fisher formulara su hipótesis del predeterminismo biológico (151) planteando por primera vez el concepto de que el cáncer de mama es una enfermedad sistémica desde el comienzo, que involucra un complejo espectro de interrelaciones entre el huésped y el tumor, y el resultado final del paciente probablemente no dependería sólo del tratamiento locorregional, la quimioterapia ha adquirido un papel más relevante en el tratamiento de la enfermedad. Sin embargo, estos tratamientos conllevan a su vez una serie de efectos adversos y suelen ser mal tolerados por las pacientes. Por otro lado, y gracias a la implantación del screening poblacional para el diagnóstico precoz de la enfermedad, cada vez son más los tumores que se diagnostican en estadios iniciales, con un tamaño pequeño y sin afectación ganglionar clínica. Este tipo de tumores, a priori con buen pronóstico, ha centrado la atención de gran número de investigadores, planteándose la posibilidad de evitar la quimioterapia en pacientes seleccionadas dentro de este grupo. Esta corriente de opinión tiene también sus detractores: es cierto que a pesar del buen pronóstico, existe una supervivencia a los 5 años del 93% según datos del SEER (385), por lo que un 7% de las pacientes mueren durante este tiempo como consecuencia del cáncer. Si fuera posible identificar ese grupo de tumores que, dentro del buen pronóstico inicial, presentaran una evolución más desfavorable, sería posible tratarlos de forma individualizada, evitando el tratamiento al 93% restante.

En esta línea de trabajo, Sigurdsson et al. (276) proponen la creación de grupos pronóstico combinando el tamaño tumoral y utilizando tres puntos de corte para la FFS. Clark et al. (398) refieren que en pacientes con cáncer de mama sin afectación ganglionar axilar (N0) la FFS añade información pronóstica adicional sólo en pacientes con tumores diploides, y concluyen que las pacientes con tumores diploides y FFS baja tienen un pronóstico especialmente favorable. Camplejohn et al. (388), en un estudio con 881 pacientes también señala la capacidad de la FFS para discriminar subgrupos de peor pronóstico dentro de los grupos de buen pronóstico, y apunta al potencial beneficio añadido de la quimioterapia en estas pacientes, dado que la eficacia de estos tratamientos aumenta cuando la tasa de división celular es alta. Chassevent et al. (336) por su parte, en un estudio con 633 pacientes con cáncer de mama en estadios iniciales, afirma que la FFS baja puede ayudar a discriminar subgrupos de pacientes sin afectación ganglionar axilar y con un pronóstico especialmente favorable, en las que podría evitarse la quimioterapia adyuvante.

Nuestros resultados, por tanto, están en la línea de los hallazgos de otros grupos de investigadores, que apuntan a la existencia de un subgrupo de peor pronóstico dentro de un grupo de pacientes ya seleccionadas por su buen pronóstico (tumores en estadios iniciales y diploides), lo que podría contribuir a individualizar aún más, si cabe, la administración de terapias adyuvantes a estas pacientes, mejorando la eficacia de los tratamientos y disminuyendo la aparición de efectos adversos.

Como conclusión a este sexto punto podríamos decir que en nuestro grupo de pacientes, la supervivencia libre de enfermedad se relacionó, de forma estadísticamente significativa, con la mayor parte de los factores pronósticos clásicos (grado histológico, tamaño tumoral, afectación ganglionar axilar, p53) y la ploidía. Por el contrario, la supervivencia global sólo se relacionó de manera estadísticamente significativa con los parámetros asociados a la proliferación celular (síntesis y FFS) y el p53.

En el subgrupo de tumores diploides, la existencia de una FFS elevada confiere un peor pronóstico, disminuyendo tanto la SG como la SLE. Es posible que la asociación de la ploidía con la FFS permita la creación de subgrupos pronóstico que ayuden a individualizar aún más los tratamientos quimioterápicos.

6. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en el estudio realizado podemos concluir lo siguiente:

6.1.- En relación con los patrones de expresión de CK18, ploidía de ADN y ciclo celular por citometría de flujo en el tumor primario:

Prácticamente todos los tumores expresaron CK18 en al menos el 10% de las células y una gran mayoría en más del 50%. Esto indica la alta especificidad de este marcador en el cáncer de mama.

De forma similar, un alto porcentaje de los tumores presentaron al menos un clon celular aneuploide, lo que pone de manifiesto la utilidad de la ploidía como marcador celular tumoral.

Por lo tanto, la combinación CK18/IP es una técnica sensible para detectar diferentes patrones de expresión de CK18 y ploidía de ADN, proporcionando una descripción detallada de diferentes clones tumorales. Esto permite una caracterización de las células metastásicas que es útil para la búsqueda de infiltración tumoral en los ganglios centinela.

Este doble marcaje CK18/IP permite, asimismo, el cálculo del porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular, pudiendo calcular así la fracción de células en fase de síntesis (FFS) de una forma mucho más fiable que con el marcaje con IP únicamente.

Basándonos en el uso combinado de ambos parámetros hemos detectado un alto grado de heterogeneidad tanto en lo referente a la ploidía del ADN como en la expresión de CK18 en el tumor primario.

En cuanto a la proliferación celular, tanto la síntesis (S) como la fracción de fase de síntesis (FFS) calculadas en este estudio fue ligeramente superior a la media estimada por otras publicaciones, lo que podría también estar en relación con la técnica de doble marcaje CK18/IP utilizada, al hacer los cálculos sobre la, o las poblaciones tumorales de forma individualizada.

Los tumores aneuploides se asociaron de manera estadísticamente significativa con FFS más elevadas que los tumores diploides.

6.2.- En relación con la comparación del patrón de expresión de CK18 y ploidía de ADN del tumor primario con el encontrado en las células metastásicas de los ganglios centinela infiltrados:

Con respecto al patrón de ploidía, existió una gran concordancia entre GC y TP. En los casos con diferente patrón de ploidía, lo más frecuente fue la pérdida de algún clon tumoral, lo que pensamos que podría ser debido a dos situaciones: la selección de muestra como reflejo de la distribución heterogénea de los diferentes clones tumorales en la misma o el potencial metastásico diferente entre los diversos clones tumorales.

El hecho de que en el 5% de casos de este estudio se haya detectado en el ganglio centinela un clon tumoral que no estaba presente en el tumor primario apoya la primera teoría, pero no puede descartarse la posibilidad de que exista diferente potencial metastásico entre clones.

Con respecto a la comparación de la expresión de CK18 entre tumor primario y ganglios centinela, hubo también una gran concordancia. Las diferencias encontradas podrían ser achacadas al proceso de permeabilización de membrana. En este sentido, la mayor expresión de CK18 en GC frente al TP estaría relacionada con una mayor disponibilidad de moléculas de anticuerpo para la misma cantidad de determinante antigénico por célula, aunque no se puede descartar que las diferencias de expresión de CK18 sean debidas a otros factores.

6.3.- En relación con la utilidad del uso de los patrones de expresión de CK18 y ploidía de ADN como prueba diagnóstica para la identificación tumoral del ganglio centinela y su comparación con el estudio inmunohistoquímico y la evolución clínica de las pacientes:

En este estudio hemos demostrado que la CMF multiparamétrica es una técnica con alta sensibilidad (93%), superior incluso a la publicada por otros autores (253, 295), con la ventaja añadida de valorar en un mismo tiempo otros factores asociados con el ciclo celular, como son la ploidía de ADN y la FFS, que tienen utilidad pronóstica. También presenta un elevado valor predictivo positivo (81%) y negativo (89%), aunque la especificidad demostrada en nuestro estudio fue ligeramente inferior (74%).

Hemos detectado 15 GC infiltrados mediante CMFm que fueron negativos por IHQ. No hemos podido demostrar con absoluta certeza que se trate de verdaderos falsos negativos de la IHQ al no haber logrado poner de manifiesto la naturaleza clonal de las células tumorales detectadas en los GC, pero existen datos (expresión de CK18, ploidía de ADN y evolución clínica) que apoyan con firmeza esta hipótesis. Aunque la

CMFm tiene herramientas para llevar a cabo esta comprobación, estas técnicas no han formado parte del presente estudio.

Nos hemos encontrado con tres limitaciones para poder demostrar la superioridad de la CMFm con respecto a la IHQ convencional: una es la limitación inherente al método estadístico en cuanto al criterio de *gold standard*, otra el no haber podido confirmar la naturaleza tumoral de las células detectadas en los casos positivos por CMFm y una tercera basada en una cuestión de selección muestral, al haberse dividido la muestra entre el laboratorio de Citometría y el de IHQ. De hecho, el análisis detallado de los casos con resultados discordantes sugiere la existencia de una distribución asimétrica de las metástasis a nivel del ganglio centinela, lo que se conoce como Sesgo de Distribución Tisular. Aunque es posible intuir la presencia de dicho sesgo en algunos casos, se decidió analizarlos igualmente ya que no era posible la comprobación del mismo analizando el resto de la muestra. Sin embargo, nos parece un punto importante a tener en cuenta en el diseño de próximos estudios.

Nuestros resultados, por tanto, avalan la CMFm como una técnica útil para valorar la infiltración metastásica a nivel del ganglio centinela en el carcinoma de mama en estadios iniciales. Teniendo en cuenta las características de la CMF multiparamétrica actual, nosotros afirmamos que dicha técnica sería plenamente comparable con la técnica OSNA (296), con la ventaja, además, de poder obtener, en la misma determinación, información sobre otros parámetros que aportan valor pronóstico adicional, como la ploidía de ADN y la porción de células en fase de síntesis o proliferación celular (FFS).

6.4.- En relación con el estudio de las características biológicas y/o factores predictivos en el tumor primario y su asociación o no con metástasis en el ganglio centinela y la búsqueda de factores relacionados con el potencial metastásico en el tumor primario:

En este estudio hemos demostrado que tanto el tamaño tumoral como el grado histológico y la ploidía se asocian de manera estadísticamente significativa con la aparición de metástasis a nivel del ganglio centinela.

Por tanto, los tumores de mayor tamaño, más alto grado y con ADN aneuploide se comportan de manera más agresiva que aquellos tumores más pequeños, de bajo grado y con ADN diploide y tendrían, en consecuencia, peor pronóstico.

En el análisis multivariante las variables ploidía y tamaño tumoral demostraron comportarse como *factores de riesgo independientes* para la afectación metastásica del ganglio centinela.

El riesgo de afectación metastásica del ganglio centinela fue 2.7 veces mayor en tumores aneuploides que en los no aneuploides y 2.8 veces mayor en los tumores T2 que en los T1.

Los tumores aneuploides presentaron una FFS más elevada que los diploides. Esta asociación fue estadísticamente significativa.

6.5.- En relación con la correspondencia entre las características biológicas y los factores pronósticos del tumor primario y las variables relacionadas con el estudio del ciclo celular valoradas mediante CMFm (ploidía de ADN y FFS):

Hemos observado una buena correlación entre los factores pronósticos clásicos y los factores pronósticos relacionados con el estudio del ciclo celular (ploidía de ADN y FFS). Nuestros resultados son concordantes con los encontrados en la literatura internacional.

También hemos encontrado una asociación estadísticamente significativa con otros factores pronósticos adicionales, como son el p53 y el Her2-neu, cuya relación con la ploidía y la FFS está menos estudiada en las publicaciones existentes.

6.6.- En relación con el estudio de la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad en función de las características biológicas y los factores pronósticos del tumor primario, la ploidía de ADN y la FFS:

La supervivencia libre de enfermedad se relacionó de forma estadísticamente significativa con la mayor parte de los factores pronósticos clásicos (grado histológico, tamaño tumoral, afectación ganglionar axilar, p53) y la ploidía.

La supervivencia global, sin embargo, sólo se relacionó de manera estadísticamente significativa con los parámetros asociados a la proliferación celular (síntesis y FFS) y el p53.

6.7.- En relación a la propuesta de creación de grupos pronóstico:

Dentro del subgrupo de tumores *diploides*, la existencia de una *FFS elevada* confiere un peor pronóstico, disminuyendo tanto la SG como la SLE.

Es posible que la asociación de la ploidía con la FFS permita la creación de *subgrupos pronóstico* que ayuden a individualizar aún más los tratamientos quimioterápicos.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010 Dec 15;127(12):2893-917.
2. De Angelis R, Sant M, Coleman MP, Francisci S, Baili P, Pierannunzio D, et al. Cancer survival in Europe 1999-2007 by country and age: results of EUROCARE--5-a population-based study. *Lancet Oncol*. 2014 Jan;15(1):23-34.
3. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin*. 2013 Jan;63(1):11-30.
4. Vidal Lancis C, Martinez-Sanchez JM, Mateos Mazon M, Peris Tuser M. [Breast cancer mortality trend in Spain and its autonomous communities during the period 1980-2005]. *Rev Esp Salud Publica*. 2010 Jan-Feb;84(1):53-9.
5. Pollan M, Michelena MJ, Ardanaz E, Izquierdo A, Sanchez-Perez MJ, Torrella A. Breast cancer incidence in Spain before, during and after the implementation of screening programmes. *Ann Oncol*. 2010 May;21 Suppl 3:iii97-102.
6. Pollan M, Pastor-Barriuso R, Ardanaz E, Arguelles M, Martos C, Galceran J, et al. Recent changes in breast cancer incidence in Spain, 1980-2004. *J Natl Cancer Inst*. 2009 Nov 18;101(22):1584-91.
7. Warner E. Clinical practice. Breast-cancer screening. *N Engl J Med*. 2011 Sep 15;365(11):1025-32.
8. Tavassoli FA, editor. *Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs (IARC WHO Classification of Tumours)*. Lyon2003.
9. <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/pat-gen/bb4/bb4-chap1.pdf>. *Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs (IARC WHO Classification of Tumours)*. 2003.
10. Lakhani SR, editor. *WHO Classification of Tumours of the Breast, Fourth Edition: The International Agency for Research on Cancer (IARC)*; 2013.
11. Sinn HP, Kreipe H. A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition. *Breast Care (Basel)*. 2013 May;8(2):149-54.
12. Berndt H, Titze U. TNM clinical stage classification of breast cancer. *Int J Cancer*. 1969 Nov 15;4(6):837-44.
13. Arnone P, Zurrida S, Viale G, Dellapasqua S, Montagna E, Arnaboldi P, et al. The TNM classification of breast cancer: need for change. *Updates Surg*. 2010 Oct;62(2):75-81.
14. Zurrida S, Veronesi U. A new TNM classification for breast cancer to meet the demands of the present and the challenges of the future. *Womens Health (Lond Engl)*. 2011 Jan;7(1):41-9.
15. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol*. 2010 Jun;17(6):1471-4.
16. Fleming ID, editor. *AJCC Cancer Staging Manual*. 5th edition. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997.
17. Singletary SE, Allred C, Ashley P, Bassett LW, Berry D, Bland KI, et al. Staging system for breast cancer: revisions for the 6th edition of the AJCC Cancer Staging Manual. *Surg Clin North Am*. 2003 Aug;83(4):803-19.

18. Greene F, Page, DL, Fleming, ID,, editor. AJCC (American Joint Committee on Cancer) Cancer Staging Manual, 6th ed, . New York: Springer-Verlag; 2002.
19. Cserni G, Amendoeira I, Bianchi S, Chmielik E, Degaetano J, Faverly D, et al. Distinction of isolated tumour cells and micrometastasis in lymph nodes of breast cancer patients according to the new Tumour Node Metastasis (TNM) definitions. *Eur J Cancer*. 2011 Apr;47(6):887-94.
20. Newman LA, Kuerer HM, Fornage B, Mirza N, Hunt KK, Ross MI, et al. Adverse prognostic significance of infraclavicular lymph nodes detected by ultrasonography in patients with locally advanced breast cancer. *Am J Surg*. 2001 Apr;181(4):313-8.
21. Klauber-DeMore N, Bevilacqua JL, Van Zee KJ, Borgen P, Cody HS, 3rd. Comprehensive review of the management of internal mammary lymph node metastases in breast cancer. *J Am Coll Surg*. 2001 Nov;193(5):547-55.
22. Engelhardt EG, Garvelink MM, de Haes JH, van der Hoeven JJ, Smets EM, Pieterse AH, et al. Predicting and communicating the risk of recurrence and death in women with early-stage breast cancer: a systematic review of risk prediction models. *J Clin Oncol*. 2014 Jan 20;32(3):238-50.
23. Williams C, Brunskill S, Altman D, Briggs A, Campbell H, Clarke M, et al. Cost-effectiveness of using prognostic information to select women with breast cancer for adjuvant systemic therapy. *Health Technol Assess*. 2006 Sep;10(34):iii-iv, ix-xi, 1-204.
24. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, et al. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med*. 2000 Jul;124(7):966-78.
25. Rakha EA, Ellis IO. An overview of assessment of prognostic and predictive factors in breast cancer needle core biopsy specimens. *J Clin Pathol*. 2007 Dec;60(12):1300-6.
26. Nicolini A, Ferrari P, Cavazzana A, Carpi A, Berti P, Miccoli P. Conventional and new emerging prognostic factors in breast cancer: an update. *Biomark Med*. 2007 Dec;1(4):525-40.
27. Rezaianzadeh A, Talei A, Rajaeefard A, Hasanzadeh J, Tabatabai H, Tahmasebi S, et al. Vascular invasion as an independent prognostic factor in lymph node negative invasive breast cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13(11):5767-72.
28. Ferretti G, Felici A, Papaldo P, Fabi A, Cognetti F. HER2/neu role in breast cancer: from a prognostic foe to a predictive friend. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2007 Feb;19(1):56-62.
29. Petrelli F, Barni S. Role of HER2-neu as a prognostic factor for survival and relapse in pT1a-bN0M0 breast cancer: a systematic review of the literature with a pooled-analysis. *Med Oncol*. 2012 Dec;29(4):2586-93.
30. Murthy V, Chamberlain RS. Recommendation to revise the AJCC/UICC breast cancer staging system for inclusion of proven prognostic factors: ER/PR receptor status and HER2 neu. *Clin Breast Cancer*. 2011 Oct;11(5):346-7.
31. Bagaria SP, Ray PS, Sim MS, Ye X, Shamonki JM, Cui X, et al. Personalizing Breast Cancer Staging by the Inclusion of ER, PR, and HER2. *JAMA Surg*. 2014 Feb 1;149(2):125-9.
32. Benson JR, Weaver DL, Mittra I, Hayashi M. The TNM staging system and breast cancer. *Lancet Oncol*. 2003 Jan;4(1):56-60.

33. Escobar PF, Patrick RJ, Rybicki LA, Weng DE, Crowe JP. The 2003 revised TNM staging system for breast cancer: results of stage re-classification on survival and future comparisons among stage groups. *Ann Surg Oncol*. 2007 Jan;14(1):143-7.
34. Martín Virginillo J. Breve reseña histórica del TNM. *Rev Argent Radiol*. 2012;76(2).
35. Printz C. New AJCC cancer staging manual reflects changes in cancer knowledge. *Cancer*. 2010 Jan 1;116(1):2-3.
36. Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Senn HJ. Meeting highlights: International Consensus Panel on the Treatment of Primary Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1998 Nov 4;90(21):1601-8.
37. Love RR, Duc NB, Dinh NV, Quy TT, Xin Y, Havighurst TC. Young age as an adverse prognostic factor in premenopausal women with operable breast cancer. *Clin Breast Cancer*. 2002 Jan;2(4):294-8.
38. Yildirim E, Dalgic T, Berberoglu U. Prognostic significance of young age in breast cancer. *J Surg Oncol*. 2000 Aug;74(4):267-72.
39. Pourzand A, Fakhree MB, Hashemzadeh S, Halimi M, Daryani A. Hormone receptor status in breast cancer and its relation to age and other prognostic factors. *Breast Cancer (Auckl)*. 2011;5:87-92.
40. Protani M, Coory M, Martin JH. Effect of obesity on survival of women with breast cancer: systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 Oct;123(3):627-35.
41. Chang SH, Pollack LM, Colditz GA. Obesity, mortality, and life years lost associated with breast cancer in nonsmoking US Women, National Health Interview Survey, 1997-2000. *Prev Chronic Dis*. 2013;10:E186.
42. Brown KA, Simpson ER. Obesity and breast cancer: progress to understanding the relationship. *Cancer Res*. 2010 Jan 1;70(1):4-7.
43. Brown KA, Simpson ER. Obesity and breast cancer: mechanisms and therapeutic implications. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2012;4:2515-24.
44. Carmichael AR. Obesity as a risk factor for development and poor prognosis of breast cancer. *BJOG*. 2006 Oct;113(10):1160-6.
45. Kalogerakos K, Sofoudis C, Tzonis P, Koutsouradis P, Katsoulis G. Breast cancer and pregnancy; overview of international bibliography. *J BUON*. 2013 Apr-Jun;18(2):308-13.
46. Michieletto S, Saibene T, Evangelista L, Barbazza F, Grigoletto R, Rossi G, et al. Preliminary monocentric results of biological characteristics of pregnancy associated breast cancer. *Breast*. 2014 Feb;23(1):19-25.
47. Azim HA, Jr., Santoro L, Russell-Edu W, Pentheroudakis G, Pavlidis N, Peccatori FA. Prognosis of pregnancy-associated breast cancer: a meta-analysis of 30 studies. *Cancer Treat Rev*. 2012 Nov;38(7):834-42.
48. Eedarapalli P, Jain S. Breast cancer in pregnancy. *J Obstet Gynaecol*. 2006 Jan;26(1):1-4.
49. Fisher B, Bauer M, Wickerham DL, Redmond CK, Fisher ER, Cruz AB, et al. Relation of number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. An NSABP update. *Cancer*. 1983 Nov 1;52(9):1551-7.
50. Axelsson CK, Mouridsen HT, Zedeler K. Axillary dissection of level I and II lymph nodes is important in breast cancer classification. The Danish Breast Cancer Cooperative Group (DBCG). *Eur J Cancer*. 1992;28A(8-9):1415-8.

51. Mersin H, Yildirim E, Bulut H, Berberoglu U. The prognostic significance of total lymph node number in patients with axillary lymph node-negative breast cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2003 Mar;29(2):132-8.
52. Petrek JA, Blackwood MM. Axillary dissection: current practice and technique. *Curr Probl Surg*. 1995 Apr;32(4):257-323.
53. Yao MS, Kurland BF, Smith AH, Schubert EK, Dunnwald LK, Byrd DR, et al. Internal mammary nodal chain drainage is a prognostic indicator in axillary node-positive breast cancer. *Ann Surg Oncol*. 2007 Oct;14(10):2985-93.
54. Noushi F, Spillane AJ, Uren RF, Gebiski V. Internal mammary lymph node metastasis in breast cancer: predictive models to assist with prognostic influence. *Breast*. 2011 Jun;20(3):278-83.
55. Dellapasqua S, Bagnardi V, Balduzzi A, Iorfida M, Rotmensz N, Santillo B, et al. Outcomes of patients with breast cancer who present with ipsilateral supraclavicular or internal mammary lymph node metastases. *Clin Breast Cancer*. 2014 Feb;14(1):53-60.
56. Veronesi U, Paganelli G, Galimberti V, Viale G, Zurrada S, Bedoni M, et al. Sentinel-node biopsy to avoid axillary dissection in breast cancer with clinically negative lymph-nodes. *Lancet*. 1997 Jun 28;349(9069):1864-7.
57. Veronesi U. The sentinel node and breast cancer. *Br J Surg*. 1999 Jan;86(1):1-2.
58. Veronesi U, Zurrada S. Present and future of sentinel node lymphadenectomy in breast cancer. *Recent Results Cancer Res*. 2000;157:221-7.
59. Krag DN. Minimal access surgery for staging regional lymph nodes: the sentinel-node concept. *Curr Probl Surg*. 1998 Nov;35(11):951-1016.
60. Krag D, Weaver D, Ashikaga T, Moffat F, Klimberg VS, Shriver C, et al. The sentinel node in breast cancer--a multicenter validation study. *N Engl J Med*. 1998 Oct 1;339(14):941-6.
61. Weaver DL, Krag DN, Ashikaga T, Harlow SP, O'Connell M. Pathologic analysis of sentinel and nonsentinel lymph nodes in breast carcinoma: a multicenter study. *Cancer*. 2000 Mar 1;88(5):1099-107.
62. Fisher B, Slack NH, Bross ID. Cancer of the breast: size of neoplasm and prognosis. *Cancer*. 1969 Nov;24(5):1071-80.
63. Comen EA, Norton L, Massague J. Breast cancer tumor size, nodal status, and prognosis: biology trumps anatomy. *J Clin Oncol*. 2011 Jul 1;29(19):2610-2.
64. Mirza AN, Mirza NQ, Vlastos G, Singletary SE. Prognostic factors in node-negative breast cancer: a review of studies with sample size more than 200 and follow-up more than 5 years. *Ann Surg*. 2002 Jan;235(1):10-26.
65. Henson DE, Ries L, Freedman LS, Carriaga M. Relationship among outcome, stage of disease, and histologic grade for 22,616 cases of breast cancer. The basis for a prognostic index. *Cancer*. 1991 Nov 15;68(10):2142-9.
66. Pinder SE, Murray S, Ellis IO, Trihia H, Elston CW, Gelber RD, et al. The importance of the histologic grade of invasive breast carcinoma and response to chemotherapy. *Cancer*. 1998 Oct 15;83(8):1529-39.
67. Simpson JF, Gray R, Dressler LG, Cobau CD, Falkson CI, Gilchrist KW, et al. Prognostic value of histologic grade and proliferative activity in axillary node-positive breast cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Companion Study, EST 4189. *J Clin Oncol*. 2000 May;18(10):2059-69.

68. Contesso G, Mouriessse H, Friedman S, Genin J, Sarrazin D, Rouesse J. The importance of histologic grade in long-term prognosis of breast cancer: a study of 1,010 patients, uniformly treated at the Institut Gustave-Roussy. *J Clin Oncol.* 1987 Sep;5(9):1378-86.
69. Ellis IO, Galea M, Broughton N, Locker A, Blamey RW, Elston CW. Pathological prognostic factors in breast cancer. II. Histological type. Relationship with survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology.* 1992 Jun;20(6):479-89.
70. Diaz J, Stead L, Shapiro N, Newell R, Loudig O, Lo Y, et al. Mitotic counts in breast cancer after neoadjuvant systemic chemotherapy and development of metastatic disease. *Breast Cancer Res Treat.* 2013 Feb;138(1):91-7.
71. Zhang R, Chen HJ, Wei B, Zhang HY, Pang ZG, Zhu H, et al. Reproducibility of the Nottingham modification of the Scarff-Bloom-Richardson histological grading system and the complementary value of Ki-67 to this system. *Chin Med J (Engl).* 2010 Aug 5;123(15):1976-82.
72. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology.* 1991 Nov;19(5):403-10.
73. Galea MH, Blamey RW, Elston CE, Ellis IO. The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1992;22(3):207-19.
74. Kollias J, Vernon-Roberts E, Blamey RW, Elston CW. A simple index to predict prognosis independent of axillary node information in breast cancer: comment. *Aust N Z J Surg.* 1998 Dec;68(12):865-6.
75. Kollias J, Murphy CA, Elston CW, Ellis IO, Robertson JF, Blamey RW. The prognosis of small primary breast cancers. *Eur J Cancer.* 1999 Jun;35(6):908-12.
76. Gurleyik G, Gurleyik E, Aker F, Aktekin A, Emir S, Gungor O, et al. Lymphovascular invasion, as a prognostic marker in patients with invasive breast cancer. *Acta Chir Belg.* 2007 Jun;107(3):284-7.
77. Houvenaeghel G, Goncalves A, Classe JM, Garbay JR, Giard S, Charytensky H, et al. Characteristics and clinical outcome of T1 breast cancer: a multicenter retrospective cohort study. *Ann Oncol.* 2014 Mar;25(3):623-8.
78. Lin PH, Yeh MH, Liu LC, Chen CJ, Tsui YC, Su CH, et al. Clinical and pathologic risk factors of tumor recurrence in patients with node-negative early breast cancer after mastectomy. *J Surg Oncol.* 2013 Nov;108(6):352-7.
79. Truong PT, Yong CM, Abnoui F, Lee J, Kader HA, Hayashi A, et al. Lymphovascular invasion is associated with reduced locoregional control and survival in women with node-negative breast cancer treated with mastectomy and systemic therapy. *J Am Coll Surg.* 2005 Jun;200(6):912-21.
80. Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ. Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. *Ann Oncol.* 2005 Oct;16(10):1569-83.
81. Harris J, editor. *Diseases of the Breast.* Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2004.
82. Mylona E, Alexandrou P, Mpakali A, Giannopoulou I, Liapis G, Markaki S, et al. Clinicopathological and prognostic significance of vascular endothelial growth factors (VEGF)-C and -D and VEGF receptor 3 in invasive breast carcinoma. *Eur J Surg Oncol.* 2007 Apr;33(3):294-300.

83. Molino A, Pelosi G, Turazza M, Sperotto L, Bonetti A, Nortilli R, et al. Bone marrow micrometastases in 109 breast cancer patients: correlations with clinical and pathological features and prognosis. *Breast Cancer Res Treat.* 1997 Jan;42(1):23-30.
84. Langer I, Guller U, Worni M, Berclaz G, Singer G, Schaer G, et al. Bone marrow micrometastases do not impact disease-free and overall survival in early stage sentinel lymph node-negative breast cancer patients. *Ann Surg Oncol.* 2014 Feb;21(2):401-7.
85. Gilje B, Nordgard O, Tjensvoll K, Janssen EA, Soiland H, Smaaland R, et al. Mitotic activity and bone marrow micrometastases have independent prognostic value in node positive breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2011 Jul;128(1):137-46.
86. Fisher B, Redmond C, Fisher ER, Caplan R. Relative worth of estrogen or progesterone receptor and pathologic characteristics of differentiation as indicators of prognosis in node negative breast cancer patients: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-06. *J Clin Oncol.* 1988 Jul;6(7):1076-87.
87. Grann VR, Troxel AB, Zojwalla NJ, Jacobson JS, Hershman D, Neugut AI. Hormone receptor status and survival in a population-based cohort of patients with breast carcinoma. *Cancer.* 2005 Jun 1;103(11):2241-51.
88. Crowe JP, Jr., Gordon NH, Antunez AR, Hubay CA, Pearson OH, Marshall JS, et al. Recurrence patterns in a prospective study of patients with stage II breast cancer treated with endocrine-chemotherapy. *Surgery.* 1987 Oct;102(4):622-7.
89. Adami HO, Graffman S, Lindgren A, Sallstrom J. Prognostic implication of estrogen receptor content in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1985;5(3):293-300.
90. Hilsenbeck SG, Ravdin PM, de Moor CA, Chamness GC, Osborne CK, Clark GM. Time-dependence of hazard ratios for prognostic factors in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1998;52(1-3):227-37.
91. Khadakban D, Gorasia-Khadakban T, Vijaykumar DK, Pavithran K, Anupama R. Factors associated with better survival after surgery in metastatic breast cancer patients. *Indian J Surg Oncol.* 2013 Mar;4(1):52-8.
92. Takashima T, Onoda N, Ishikawa T, Ogawa Y, Kato Y, Fujimoto Y, et al. Prognostic value of combined analysis of estrogen receptor status and cellular proliferative activity in breast cancer patients with extensive lymph node metastases. *Oncol Rep.* 2002 May-Jun;9(3):589-94.
93. Arisio R, Sapino A, Cassoni P, Accinelli G, Cuccorese MC, Mano MP, et al. What modifies the relation between tumour size and lymph node metastases in T1 breast carcinomas? *J Clin Pathol.* 2000 Nov;53(11):846-50.
94. Zhang Z, Wang J, Skinner KA, Shayne M, Hajdu SI, Hong B, et al. Pathologic features and clinical outcomes of breast cancer according to the levels of expression of estrogen receptor. *Histopathology.* 2014 Mar 12.
95. Mdpaïman N, Md Ali SA, Mdzin R, Meor Kamal MZ, Md Amin WA, Nallusamy M, et al. Estrogen receptor-negative breast ductal carcinoma: clinicopathological features and mib-1 (ki-67) proliferative index association. *PLoS One.* 2014;9(2):e89172.
96. Tsutsui S, Ohno S, Murakami S, Hachitanda Y, Oda S. DNA aneuploidy in relation to the combination of analysis of estrogen receptor, progesterone receptor, p53 protein and epidermal growth factor receptor in 498 breast cancers. *Oncology.* 2002;63(1):48-55.

97. Wang Y, Ikeda DM, Narasimhan B, Longacre TA, Bleicher RJ, Pal S, et al. Estrogen receptor-negative invasive breast cancer: imaging features of tumors with and without human epidermal growth factor receptor type 2 overexpression. *Radiology*. 2008 Feb;246(2):367-75.
98. Lee A, Park WC, Yim HW, Lee MA, Park G, Lee KY. Expression of c-erbB2, cyclin D1 and estrogen receptor and their clinical implications in the invasive ductal carcinoma of the breast. *Jpn J Clin Oncol*. 2007 Sep;37(9):708-14.
99. Rasti M, Arabsolghar R, Khatooni Z, Mostafavi-Pour Z. p53 Binds to estrogen receptor 1 promoter in human breast cancer cells. *Pathol Oncol Res*. 2012 Apr;18(2):169-75.
100. Insa A, Lluch A, Prosper F, Marugan I, Martinez-Agullo A, Garcia-Conde J. Prognostic factors predicting survival from first recurrence in patients with metastatic breast cancer: analysis of 439 patients. *Breast Cancer Res Treat*. 1999 Jul;56(1):67-78.
101. Cabrera-Morales CM. [Determination of Her2/neu status in breast tumours: PCR versus FISH]. *Med Clin (Barc)*. 2006 Jun 3;127(1):35-6.
102. Press MF, Pike MC, Chazin VR, Hung G, Udove JA, Markowicz M, et al. Her-2/neu expression in node-negative breast cancer: direct tissue quantitation by computerized image analysis and association of overexpression with increased risk of recurrent disease. *Cancer Res*. 1993 Oct 15;53(20):4960-70.
103. Press MF, Jones LA, Godolphin W, Edwards CL, Slamon DJ. HER-2/neu oncogene amplification and expression in breast and ovarian cancers. *Prog Clin Biol Res*. 1990;354A:209-21.
104. Tiwari RK, Borgen PI, Wong GY, Cordon-Cardo C, Osborne MP. HER-2/neu amplification and overexpression in primary human breast cancer is associated with early metastasis. *Anticancer Res*. 1992 Mar-Apr;12(2):419-25.
105. Carr JA, Havstad S, Zarbo RJ, Divine G, Mackowiak P, Velanovich V. The association of HER-2/neu amplification with breast cancer recurrence. *Arch Surg*. 2000 Dec;135(12):1469-74.
106. Sahin AA. Biologic and clinical significance of HER-2/neu (cerbB-2) in breast cancer. *Adv Anat Pathol*. 2000 May;7(3):158-66.
107. Yasasever V, Dincer M, Camlica H, Duranyildiz D, Dalay N. Serum c-erb B2 oncoprotein levels are elevated in recurrent and metastatic breast cancer. *Clin Biochem*. 2000 Jun;33(4):315-7.
108. Pegram MD, Konecny G, Slamon DJ. The molecular and cellular biology of HER2/neu gene amplification/overexpression and the clinical development of herceptin (trastuzumab) therapy for breast cancer. *Cancer Treat Res*. 2000;103:57-75.
109. Rayson D, Richel D, Chia S, Jackisch C, van der Vegt S, Suter T. Anthracycline-trastuzumab regimens for HER2/neu-overexpressing breast cancer: current experience and future strategies. *Ann Oncol*. 2008 Sep;19(9):1530-9.
110. Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007 Nov 20;25(33):5287-312.
111. Arteaga CL. Can trastuzumab be effective against tumors with low HER2/Neu (ErbB2) receptors? *J Clin Oncol*. 2006 Aug 10;24(23):3722-5.
112. Rochefort H, Garcia M, Glondu M, Laurent V, Liaudet E, Rey JM, et al. Cathepsin D in breast cancer: mechanisms and clinical applications, a 1999 overview. *Clin Chim Acta*. 2000 Feb 15;291(2):157-70.

113. Stehle G, Wunder A, Hartung G, Sinn H, Heene DL. Prognostic value of cathepsin D in breast cancer. *Br J Cancer*. 1999 Dec;81(8):1427-8.
114. Brouillet JP, Theillet C, Maudelonde T, Defrenne A, Simony-Lafontaine J, Sertour J, et al. Cathepsin D assay in primary breast cancer and lymph nodes: relationship with c-myc, c-erb-B-2 and int-2 oncogene amplification and node invasiveness. *Eur J Cancer*. 1990 Apr;26(4):437-41.
115. Scorilas A, Trangas T, Yotis J, Pateras C, Talieri M. Determination of c-myc amplification and overexpression in breast cancer patients: evaluation of its prognostic value against c-erbB-2, cathepsin-D and clinicopathological characteristics using univariate and multivariate analysis. *Br J Cancer*. 1999 Dec;81(8):1385-91.
116. Reyat F, Hajage D, Savignoni A, Feron JG, Bollet MA, Kirova Y, et al. Long-term prognostic performance of Ki67 rate in early stage, pT1-pT2, pN0, invasive breast carcinoma. *PLoS One*. 2013;8(3):e55901.
117. Golmohammadi R, Pejhan A. The prognostic value of the P53 protein and the Ki67 marker in breast cancer patients. *J Pak Med Assoc*. 2012 Sep;62(9):871-5.
118. Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol*. 2010 Feb;11(2):174-83.
119. Allred DC, Clark GM, Elledge R, Fuqua SA, Brown RW, Chamness GC, et al. Association of p53 protein expression with tumor cell proliferation rate and clinical outcome in node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1993 Feb 3;85(3):200-6.
120. Allred DC, Elledge R, Clark GM, Fuqua SA. The p53 tumor-suppressor gene in human breast cancer. *Cancer Treat Res*. 1994;71:63-77.
121. Jung SY, Jeong J, Shin SH, Kwon Y, Kim EA, Ko KL, et al. Accumulation of p53 determined by immunohistochemistry as a prognostic marker in node negative breast cancer; analysis according to St Gallen consensus and intrinsic subtypes. *J Surg Oncol*. 2011 Mar 1;103(3):207-11.
122. Soontrapornchai P, Chanvitan A, Koontongkaew S, Sunpaweravong S. The prognostic value of p53 immunostaining in node-negative breast carcinoma. *J Med Assoc Thai*. 2007 Sep;90(9):1833-8.
123. Meyer JS, Coplin MD. Thymidine labeling index, flow cytometric S-phase measurement, and DNA index in human tumors. Comparisons and correlations. *Am J Clin Pathol*. 1988 May;89(5):586-95.
124. Bilir A, Ozmen V, Kecer M, Eralp Y, Cabioglu N, Ahishali B, et al. Thymidine labeling index: prognostic role in breast cancer. *Am J Clin Oncol*. 2004 Aug;27(4):400-6.
125. Meyer JS, Province M. Proliferative index of breast carcinoma by thymidine labeling: prognostic power independent of stage, estrogen and progesterone receptors. *Breast Cancer Res Treat*. 1988 Oct;12(2):191-204.
126. Meyer JS, Alvarez C, Milikowski C, Olson N, Russo I, Russo J, et al. Breast carcinoma malignancy grading by Bloom-Richardson system vs proliferation index: reproducibility of grade and advantages of proliferation index. *Mod Pathol*. 2005 Aug;18(8):1067-78.
127. Frierson HF, Jr. Ploidy analysis and S-phase fraction determination by flow cytometry of invasive adenocarcinomas of the breast. *Am J Surg Pathol*. 1991 Apr;15(4):358-67.
128. Maillo A, Diaz P, Blanco A, Lopez A, Ciudad J, Hernandez J, et al. Proportion of S-phase tumor cells measured by flow cytometry is an independent prognostic factor in meningioma tumors. *Cytometry*. 1999 Jun 15;38(3):118-23.

129. Orfao A. La citometría de flujo en el laboratorio clínico. Antoja Ribó F, editor. Salamanca: Comité de Publicaciones de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular; 1995.
130. Hedley DW. DNA analysis from paraffin-embedded blocks. *Methods Cell Biol.* 1990;33:139-47.
131. Hedley DW, Clark GM, Cornelisse CJ, Killander D, Kute T, Merkel D. DNA Cytometry Consensus Conference. Consensus review of the clinical utility of DNA cytometry in carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res Treat.* 1993 Oct;28(1):55-9.
132. Hedley DW. DNA Cytometry Consensus Conference. DNA flow cytometry and breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1993 Oct;28(1):51-3.
133. Hedley DW, Clark GM, Cornelisse CJ, Killander D, Kute T, Merkel D. Consensus review of the clinical utility of DNA cytometry in carcinoma of the breast. Report of the DNA Cytometry Consensus Conference. *Cytometry.* 1993;14(5):482-5.
134. Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol.* 1998 Feb;11(2):155-68.
135. Osborne CK. Tamoxifen in the treatment of breast cancer. *N Engl J Med.* 1998 Nov 26;339(22):1609-18.
136. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet.* 1998 May 16;351(9114):1451-67.
137. Belfiglio M, Valentini M, Pellegrini F, De Berardis G, Franciosi M, Rossi MC, et al. Twelve-year mortality results of a randomized trial of 2 versus 5 years of adjuvant tamoxifen for postmenopausal early-stage breast carcinoma patients (SITAM 01). *Cancer.* 2005 Dec 1;104(11):2334-9.
138. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet.* 2005 May 14-20;365(9472):1687-717.
139. Jankowitz RC, Davidson NE. Adjuvant endocrine therapy for breast cancer: how long is long enough? *Oncology (Williston Park).* 2013 Dec;27(12):1210-6, 24.
140. Yang LH, Tseng HS, Lin C, Chen LS, Chen ST, Kuo SJ, et al. Survival benefit of tamoxifen in estrogen receptor-negative and progesterone receptor-positive low grade breast cancer patients. *J Breast Cancer.* 2012 Sep;15(3):288-95.
141. Jaiyesimi IA, Buzdar AU, Decker DA, Hortobagyi GN. Use of tamoxifen for breast cancer: twenty-eight years later. *J Clin Oncol.* 1995 Feb;13(2):513-29.
142. Pasacreta JV, McCorkle R. Providing accurate information to women about tamoxifen therapy for breast cancer: current indications, effects, and controversies. *Oncol Nurs Forum.* 1998 Oct;25(9):1577-83.
143. Burstein HJ, Prestrud AA, Seidenfeld J, Anderson H, Buchholz TA, Davidson NE, et al. American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline: update on adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol.* 2010 Aug 10;28(23):3784-96.
144. Allred DC, Clark GM, Tandon AK, Molina R, Tormey DC, Osborne CK, et al. HER-2/neu in node-negative breast cancer: prognostic significance of overexpression influenced by the presence of in situ carcinoma. *J Clin Oncol.* 1992 Apr;10(4):599-605.
145. Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, Price KN, Save-Soderborgh J, Anbazhagan R, et al. Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol.* 1992 Jul;10(7):1049-56.

146. Ross JS, Fletcher JA, Bloom KJ, Linette GP, Stec J, Symmans WF, et al. Targeted therapy in breast cancer: the HER-2/neu gene and protein. *Mol Cell Proteomics*. 2004 Apr;3(4):379-98.
147. Thor AD, Berry DA, Budman DR, Muss HB, Kute T, Henderson IC, et al. erbB-2, p53, and efficacy of adjuvant therapy in lymph node-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1998 Sep 16;90(18):1346-60.
148. Paik S, Bryant J, Park C, Fisher B, Tan-Chiu E, Hyams D, et al. erbB-2 and response to doxorubicin in patients with axillary lymph node-positive, hormone receptor-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1998 Sep 16;90(18):1361-70.
149. Pogue-Geile KL, Kim C, Jeong JH, Tanaka N, Bandos H, Gavin PG, et al. Predicting degree of benefit from adjuvant trastuzumab in NSABP trial B-31. *J Natl Cancer Inst*. 2013 Dec 4;105(23):1782-8.
150. Baselga J, Perez EA, Pienkowski T, Bell R. Adjuvant trastuzumab: a milestone in the treatment of HER-2-positive early breast cancer. *Oncologist*. 2006;11 Suppl 1:4-12.
151. Fisher B. Breast cancer. *Postgrad Med*. 1969 Apr;45(4):73-8.
152. Fisher B. Systemic chemotherapy as an adjuvant to surgery in the treatment of breast cancer. *Cancer*. 1969 Dec;24(6):1286-9.
153. Zamora P. Epidemiología del cáncer de mama. In: Cruz J, editor. Libro del año Oncología Cáncer de mama. Madrid: Saned; 1999. p. 11-34.
154. Hellman S. Karmofsky Memorial Lecture. Natural history of small breast cancers. *J Clin Oncol*. 1994 Oct;12(10):2229-34.
155. Halsted WS. I. A Clinical and Histological Study of certain Adenocarcinomata of the Breast: and a Brief Consideration of the Supraclavicular Operation and of the Results of Operations for Cancer of the Breast from 1889 to 1898 at the Johns Hopkins Hospital. *Ann Surg*. 1898 Nov;28(5):557-76.
156. Del Val Gil JM. Cáncer de mama y mastectomía. Estado actual. *Cir Esp*. 2001;69:56-64.
157. Patey DH. A review of 146 cases of carcinoma of the breast operated on between 1930 and 1943. *Br J Cancer*. 1967 Jun;21(2):260-9.
158. Madden JL, Kandalaf S, Bourque RA. Modified radical mastectomy. *Ann Surg*. 1972 May;175(5):624-34.
159. Meric-Bernstam F. Breast conservation in breast cancer: surgical and adjuvant considerations. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2004 Feb;16(1):31-6.
160. Veronesi U, Saccozzi R, Del Vecchio M, Banfi A, Clemente C, De Lena M, et al. Comparing radical mastectomy with quadrantectomy, axillary dissection, and radiotherapy in patients with small cancers of the breast. *N Engl J Med*. 1981 Jul 2;305(1):6-11.
161. Veronesi U, Cascinelli N, Mariani L, Greco M, Saccozzi R, Luini A, et al. Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. *N Engl J Med*. 2002 Oct 17;347(16):1227-32.
162. Fisher B, Anderson S, Bryant J, Margolese RG, Deutsch M, Fisher ER, et al. Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N Engl J Med*. 2002 Oct 17;347(16):1233-41.

163. Bartelink H, Horiot JC, Poortmans P, Struikmans H, Van den Bogaert W, Barillot I, et al. Recurrence rates after treatment of breast cancer with standard radiotherapy with or without additional radiation. *N Engl J Med*. 2001 Nov 8;345(19):1378-87.
164. Blichert-Toft M, Nielsen M, Daring M, Moller S, Rank F, Overgaard M, et al. Long-term results of breast conserving surgery vs. mastectomy for early stage invasive breast cancer: 20-year follow-up of the Danish randomized DBCG-82TM protocol. *Acta Oncol*. 2008;47(4):672-81.
165. Arriagada R, Le MG, Rochard F, Contesso G. Conservative treatment versus mastectomy in early breast cancer: patterns of failure with 15 years of follow-up data. Institut Gustave-Roussy Breast Cancer Group. *J Clin Oncol*. 1996 May;14(5):1558-64.
166. Sakorafas GH, Tsiotou AG. Selection criteria for breast conservation in breast cancer. *Eur J Surg*. 2000 Nov;166(11):835-46.
167. Senkus E, Kyriakides S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Thompson A, Zackrisson S, et al. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2013 Oct;24 Suppl 6:vi7-23.
168. Del Barco S, Ciruelos E, Tusquets I, Ruiz M, Barnadas A. SEOM clinical guidelines for the systemic treatment of early breast cancer 2013. *Clin Transl Oncol*. 2013 Dec;15(12):1011-7.
169. Petrek JA, Pressman PI, Smith RA. Lymphedema: current issues in research and management. *CA Cancer J Clin*. 2000 Sep-Oct;50(5):292-307; quiz 8-11.
170. Harris SR, Hugi MR, Olivetto IA, Levine M. Clinical practice guidelines for the care and treatment of breast cancer: 11. Lymphedema. *CMAJ*. 2001 Jan 23;164(2):191-9.
171. Zengel B, Yazarbas U, Sirinocak A, Ozkok G, Denecli AG, Postaci H, et al. Sentinel lymph node biopsy in breast cancer: review on various methodological approaches. *Tumori*. 2013 Mar-Apr;99(2):149-53.
172. Sakorafas GH, Tsiotou AG, Balsiger BM. Axillary lymph node dissection in breast cancer--current status and controversies, alternative strategies and future perspectives. *Acta Oncol*. 2000;39(4):455-66.
173. Sakorafas GH, Tsiotou AG. Sentinel lymph node biopsy in breast cancer. *Am Surg*. 2000 Jul;66(7):667-74.
174. Cabanas RM. An approach for the treatment of penile carcinoma. *Cancer*. 1977 Feb;39(2):456-66.
175. Morton DL, Wen DR, Wong JH, Economou JS, Cagle LA, Storm FK, et al. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg*. 1992 Apr;127(4):392-9.
176. van der Veen H, Hoekstra OS, Paul MA, Cuesta MA, Meijer S. Gamma probe-guided sentinel node biopsy to select patients with melanoma for lymphadenectomy. *Br J Surg*. 1994 Dec;81(12):1769-70.
177. Krag DN, Weaver DL, Alex JC, Fairbank JT. Surgical resection and radiolocalization of the sentinel lymph node in breast cancer using a gamma probe. *Surg Oncol*. 1993 Dec;2(6):335-9; discussion 40.
178. Giuliano AE, Kirgan DM, Guenther JM, Morton DL. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. *Ann Surg*. 1994 Sep;220(3):391-8; discussion 8-401.
179. Bernet L ea. Consenso sobre la biopsia selectiva del ganglio centinela en el cáncer de mama. Revisión 2013 de la Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria

sobre la biopsia selectiva del ganglio centinela en el cáncer de mama. Revisión 2013 de la Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria. *Rev Esp Patol.* 2014.

180. Singletary SE. Minimally invasive surgery in breast cancer treatment. *Biomed Pharmacother.* 2001 Nov;55(9-10):510-4.

181. Giuliano AE. See one, do twenty-five, teach one: the implementation of sentinel node dissection in breast cancer. *Ann Surg Oncol.* 1999 Sep;6(6):520-1.

182. Cox CE, Haddad F, Bass S, Cox JM, Ku NN, Berman C, et al. Lymphatic mapping in the treatment of breast cancer. *Oncology (Williston Park).* 1998 Sep;12(9):1283-92; discussion 93-4, 97-8.

183. Albertini JJ, Lyman GH, Cox C, Yeatman T, Balducci L, Ku N, et al. Lymphatic mapping and sentinel node biopsy in the patient with breast cancer. *JAMA.* 1996 Dec 11;276(22):1818-22.

184. Albertini JJ, Cruse CW, Rapaport D, Wells K, Ross M, DeConti R, et al. Intraoperative radio-lympho-scintigraphy improves sentinel lymph node identification for patients with melanoma. *Ann Surg.* 1996 Feb;223(2):217-24.

185. O'Hea BJ, Hill AD, El-Shirbiny AM, Yeh SD, Rosen PP, Coit DG, et al. Sentinel lymph node biopsy in breast cancer: initial experience at Memorial Sloan-Kettering Cancer Center. *J Am Coll Surg.* 1998 Apr;186(4):423-7.

186. Barnwell JM, Arredondo MA, Kollmorgen D, Gibbs JF, Lamonica D, Carson W, et al. Sentinel node biopsy in breast cancer. *Ann Surg Oncol.* 1998 Mar;5(2):126-30.

187. Ellis RL, Seifert PJ, Neal CE, Pavolka KR, Mann JL, Malafa MP, et al. Periareolar injection for localization of sentinel nodes in breast cancer patients. *Breast J.* 2004 Mar-Apr;10(2):94-100.

188. Kern KA, Rosenberg RJ. Preoperative lymphoscintigraphy during lymphatic mapping for breast cancer: improved sentinel node imaging using subareolar injection of technetium 99m sulfur colloid. *J Am Coll Surg.* 2000 Nov;191(5):479-89.

189. Zavagno G, Meggiolaro F, Rossi CR, Casara D, Pescarini L, Marchet A, et al. Subareolar injection for sentinel lymph node location in breast cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2002 Nov;28(7):701-4.

190. Vidal-Sicart S, Rioja Martin ME. [Scintigraphic and intraoperative detection of the sentinel lymph node in breast cancer]. *Rev Esp Med Nucl.* 2009 Jan-Feb;28(1):41-3.

191. Giuliano AE, Dale PS, Turner RR, Morton DL, Evans SW, Krasne DL. Improved axillary staging of breast cancer with sentinel lymphadenectomy. *Ann Surg.* 1995 Sep;222(3):394-9; discussion 9-401.

192. Cserni G. Histopathologic examination of the sentinel lymph nodes. *Breast J.* 2006 Sep-Oct;12(5 Suppl 2):S152-6.

193. Cserni G. What is a positive sentinel lymph node in a breast cancer patient? A practical approach. *Breast.* 2007 Apr;16(2):152-60.

194. Cserni G. Intraoperative analysis of sentinel lymph nodes in breast cancer by one-step nucleic acid amplification. *J Clin Pathol.* 2012 Mar;65(3):193-9.

195. Le Frere-Belda MA, Bats AS, Gillaizeau F, Poulet B, Clough KB, Nos C, et al. Diagnostic performance of one-step nucleic acid amplification for intraoperative sentinel node metastasis detection in breast cancer patients. *Int J Cancer.* 2012 May 15;130(10):2377-86.

196. Tamaki Y, Akiyama F, Iwase T, Kaneko T, Tsuda H, Sato K, et al. Molecular detection of lymph node metastases in breast cancer patients: results of a multicenter trial using the one-step nucleic acid amplification assay. *Clin Cancer Res*. 2009 Apr 15;15(8):2879-84.
197. Chaudhry A, Williams S, Cook J, Jenkins M, Sohail M, Calder C, et al. The real-time intra-operative evaluation of sentinel lymph nodes in breast cancer patients using One Step Nucleic Acid Amplification (OSNA) and implications for clinical decision-making. *Eur J Surg Oncol*. 2014 Feb;40(2):150-7.
198. Vilardell F, Matias-Guiu X. CK19 expression should be tested prior to OSNA analysis of sentinel lymph nodes in breast cancer. *Virchows Arch*. 2013 Jan;462(1):121.
199. Vilardell F, Novell A, Martin J, Santacana M, Velasco A, Diez-Castro MJ, et al. Importance of assessing CK19 immunostaining in core biopsies in patients subjected to sentinel node study by OSNA. *Virchows Arch*. 2012 Jun;460(6):569-75.
200. Acea Nebril B. Controversias en torno a la biopsia del ganglio centinela en enfermas con cáncer de mama. ¿Qué dice la medicina basada en la evidencia? *Cir Esp*. 2003;76(6):354-60.
201. Sola M, Alberro JA, Fraile M, Santesteban P, Ramos M, Fabregas R, et al. Complete axillary lymph node dissection versus clinical follow-up in breast cancer patients with sentinel node micrometastasis: final results from the multicenter clinical trial AATRM 048/13/2000. *Ann Surg Oncol*. 2013 Jan;20(1):120-7.
202. Giuliano AE, McCall L, Beitsch P, Whitworth PW, Blumencranz P, Leitch AM, et al. Locoregional recurrence after sentinel lymph node dissection with or without axillary dissection in patients with sentinel lymph node metastases: the American College of Surgeons Oncology Group Z0011 randomized trial. *Ann Surg*. 2010 Sep;252(3):426-32; discussion 32-3.
203. Bilimoria KY, Bentrem DJ, Hansen NM, Bethke KP, Rademaker AW, Ko CY, et al. Comparison of sentinel lymph node biopsy alone and completion axillary lymph node dissection for node-positive breast cancer. *J Clin Oncol*. 2009 Jun 20;27(18):2946-53.
204. Yi M, Giordano SH, Meric-Bernstam F, Mittendorf EA, Kuerer HM, Hwang RF, et al. Trends in and outcomes from sentinel lymph node biopsy (SLNB) alone vs. SLNB with axillary lymph node dissection for node-positive breast cancer patients: experience from the SEER database. *Ann Surg Oncol*. 2010 Oct;17 Suppl 3:343-51.
205. McGuckin MA, Cummings MC, Walsh MD, Hohn BG, Bennett IC, Wright RG. Occult axillary node metastases in breast cancer: their detection and prognostic significance. *Br J Cancer*. 1996 Jan;73(1):88-95.
206. Pendas S, Dauway E, Cox CE, Giuliano R, Ku NN, Schreiber RH, et al. Sentinel node biopsy and cytokeratin staining for the accurate staging of 478 breast cancer patients. *Am Surg*. 1999 Jun;65(6):500-5; discussion 5-6.
207. Schreiber RH, Pendas S, Ku NN, Reintgen DS, Shons AR, Berman C, et al. Microstaging of breast cancer patients using cytokeratin staining of the sentinel lymph node. *Ann Surg Oncol*. 1999 Jan-Feb;6(1):95-101.
208. Orfao A, Ciudad J, Gonzalez M, Lopez A, del Mar Abad M, Paz Bouza JI, et al. Flow cytometry in the diagnosis of cancer. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 1995;221:145-52.
209. Vidriales MB, San-Miguel JF, Orfao A, Coustan-Smith E, Campana D. Minimal residual disease monitoring by flow cytometry. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2003 Dec;16(4):599-612.

210. Pantel K. Minimal residual disease. Introductory overview. *Cancer Metastasis Rev.* 1999;18(1):1-2.
211. Chang Q, Hedley D. Emerging applications of flow cytometry in solid tumor biology. *Methods.* 2012 Jul;57(3):359-67.
212. Leers MP. Intermediate filaments and multiparameter flow cytometry for the study of solid tumors. *Methods Cell Biol.* 2004;78:163-204.
213. Pantel K, Otte M. Identification and characterisation of minimal residual disease in solid tumors. *Acta Med Austriaca Suppl.* 2000;52:8-12.
214. Serrano MJ, Sanchez-Rovira P, Delgado-Rodriguez M, Gaforio JJ. Detection of circulating tumor cells in the context of treatment: prognostic value in breast cancer. *Cancer Biol Ther.* 2009 Apr;8(8):671-5.
215. Nadal R, Lorente JA, Rosell R, Serrano MJ. Relevance of molecular characterization of circulating tumor cells in breast cancer in the era of targeted therapies. *Expert Rev Mol Diagn.* 2013 Apr;13(3):295-307.
216. Nadal R, Fernandez A, Sanchez-Rovira P, Salido M, Rodriguez M, Garcia-Puche JL, et al. Biomarkers characterization of circulating tumour cells in breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* 2012;14(3):R71.
217. Ignatiadis M, Sotiriou C, Pantel K. Minimal residual disease and circulating tumor cells in breast cancer: open questions for research. *Recent Results Cancer Res.* 2012;195:3-9.
218. Berho M, Viciano AL, Poppiti RJ, Ruiz P. DNA flow cytometric measurements in breast cancer: a review of the instrumentation principles and clinical significance. *J Fla Med Assoc.* 1997 Feb;84(2):104-10.
219. Hedley DW, Shankey TV, Wheelless LL. DNA cytometry consensus conference. *Cytometry.* 1993;14(5):471.
220. Shankey TV, Rabinovitch PS, Bagwell B, Bauer KD, Duque RE, Hedley DW, et al. Guidelines for implementation of clinical DNA cytometry. *International Society for Analytical Cytology. Cytometry.* 1993;14(5):472-7.
221. Gross HJ, Verwer B, Houck D, Hoffman RA, Recktenwald D. Model study detecting breast cancer cells in peripheral blood mononuclear cells at frequencies as low as 10⁻⁷. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Jan 17;92(2):537-41.
222. Cruz I, Ciudad J, Cruz JJ, Ramos M, Gomez-Alonso A, Adansa JC, et al. Evaluation of multiparameter flow cytometry for the detection of breast cancer tumor cells in blood samples. *Am J Clin Pathol.* 2005 Jan;123(1):66-74.
223. Racila E, Euhus D, Weiss AJ, Rao C, McConnell J, Terstappen LW, et al. Detection and characterization of carcinoma cells in the blood. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Apr 14;95(8):4589-94.
224. Sampedro A. DNA cytometric analysis. Oviedo: Universidad de Oviedo; 1993.
225. Melamed MR MP, Shapiro HM. An historical review of the development of flow cytometry and sorters. In: Melamed MR LT, Mendelsohn ML., editor. *Flow cytometry and sorters.* Nueva York.: John Wiley and sons. p. 1-10.
226. Moll R. Cytokeratins as markers of differentiation in the diagnosis of epithelial tumors. *Subcell Biochem.* 1998;31:205-62.

227. Funke I, Schraut W. Meta-analyses of studies on bone marrow micrometastases: an independent prognostic impact remains to be substantiated. *J Clin Oncol*. 1998 Feb;16(2):557-66.
228. Funke I, Schraut W. Bone marrow metastases in breast cancer. *N Engl J Med*. 2000 Aug 24;343(8):577; author reply 8.
229. Moll R, Lowe A, Laufer J, Franke WW. Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. *Am J Pathol*. 1992 Feb;140(2):427-47.
230. Hochtlen-Vollmar W, Gruber R, Bodenmuller H, Felber E, Lindemann F, Passlick B, et al. Occult epithelial tumor cells detected in bone marrow by an enzyme immunoassay specific for cytokeratin 19. *Int J Cancer*. 1997 Feb 7;70(4):396-400.
231. Kahn HJ, Yang LY, Blondal J, Lickley L, Holloway C, Hanna W, et al. RT-PCR amplification of CK19 mRNA in the blood of breast cancer patients: correlation with established prognostic parameters. *Breast Cancer Res Treat*. 2000 Mar;60(2):143-51.
232. Aerts J, Wynendaele W, Paridaens R, Christiaens MR, van den Bogaert W, van Oosterom AT, et al. A real-time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) to detect breast carcinoma cells in peripheral blood. *Ann Oncol*. 2001 Jan;12(1):39-46.
233. Hu XC, Chow LW. Detection of circulating breast cancer cells with multiple-marker RT-PCR assay. *Anticancer Res*. 2001 Jan-Feb;21(1A):421-4.
234. Peschos D, Stefanou D, Vougiouklakis T, Assimakopoulos DA, Agnantis NJ. Cell cycle proteins in laryngeal cancer: role in proliferation and prognosis. *J Exp Clin Cancer Res*. 2005 Sep;24(3):431-7.
235. Visakorpi T, Kylmala T, Tainio H, Koivula T, Tammela T, Isola J. High cell proliferation activity determined by DNA flow cytometry predicts poor prognosis after relapse in prostate cancer. *Eur J Cancer*. 1994;30A(1):129-30.
236. Skalova A, Leivo I, Von Boguslawsky K, Saksela E. Cell proliferation correlates with prognosis in acinic cell carcinomas of salivary gland origin. Immunohistochemical study of 30 cases using the MIB 1 antibody in formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol*. 1994 May;173(1):13-21.
237. Tumuluri V. The relationship between cell proliferation and prognosis in oral cancer. *Ann R Australas Coll Dent Surg*. 2002 Oct;16:158-9.
238. Kanjer K, Tatic S, Neskovic-Konstantinovic Z, Abu Rabi Z, Nikolic-Vukosavljevic D. Treatment response to preoperative anthracycline-based chemotherapy in locally advanced breast cancer: the relevance of proliferation and apoptosis rates. *Pathol Oncol Res*. 2013 Jul;19(3):577-88.
239. Railo M, Lundin J, Haglund C, von Smitten K, Nordling S. Ki-67, p53, ER receptors, ploidy and S phase as long-term prognostic factors in T1 node-negative breast cancer. *Tumour Biol*. 2007;28(1):45-51.
240. Moureau-Zabotto L, Bouchet C, Cesari D, Uzan S, Lefranc JP, Antoine M, et al. Combined flow cytometry determination of S-phase fraction and DNA ploidy is an independent prognostic factor in node-negative invasive breast carcinoma: analysis of a series of 271 patients with stage I and II breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2005 May;91(1):61-71.
241. Kudela M, Pilka R, Lubusky M, Hejtmanek P, Dzubak P, Brychtova S. Prognostic importance of selected molecular immunohistochemical markers and DNA ploidy in endometrial cancer. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2012;33(2):159-63.

242. Martínez Jabaloyas JM, Ruiz Cerda JL, Sanz Chinesta S, Jimenez A, Hernandez M, Jimenez Cruz JF. [Prognostic value of DNA ploidy in prostatic cancer]. *Actas Urol Esp.* 2001 Apr;25(4):283-90.
243. Orfao A, Garcia-Sanz R, Lopez-Berges MC, Belen Vidriales M, Gonzalez M, Caballero MD, et al. A new method for the analysis of plasma cell DNA content in multiple myeloma samples using a CD38/propidium iodide double staining technique. *Cytometry.* 1994 Dec 1;17(4):332-9.
244. Sanchez-Carbayo M, Ciudad J, Urrutia M, Navajo JA, Orfao A. Diagnostic performance of the urinary bladder carcinoma antigen ELISA test and multiparametric DNA/cytokeratin flow cytometry in urine voided samples from patients with bladder carcinoma. *Cancer.* 2001 Dec 1;92(11):2811-9.
245. Vindelov LL, Christensen IJ, Nissen NI. A detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. *Cytometry.* 1983 Mar;3(5):323-7.
246. Gross HJ, Verwer B, Houck D, Recktenwald D. Detection of rare cells at a frequency of one per million by flow cytometry. *Cytometry.* 1993;14(5):519-26.
247. Bloom HJ, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer.* 1957 Sep;11(3):359-77.
248. Escrig-Sos J, Martínez-Ramos D, Miralles-Tena JM. [Diagnostic tests: basic concepts for their correct interpretation and use]. *Cir Esp.* 2006 May;79(5):267-73.
249. Manterola C. Cómo interpretar un artículo sobre pruebas diagnósticas. *Rev Med Clin Condes.* 2009;20(5):708-17.
250. Jarasch ED, Nagle RB, Kaufmann M, Maurer C, Bocker WJ. Differential diagnosis of benign epithelial proliferations and carcinomas of the breast using antibodies to cytokeratins. *Hum Pathol.* 1988 Mar;19(3):276-89.
251. Alam SM, Whitford P, Cushley W, George WD, Campbell AM. Aneuploid subpopulations in tumour-invaded lymph nodes from breast cancer patients. *Eur J Cancer.* 1992;28(2-3):357-62.
252. Kang HS, Youn YK, Oh SK, Choe KJ, Noh DY. Flow cytometric analysis of primary tumors and their corresponding metastatic nodes in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2000 Sep;63(1):81-7.
253. Leers MP, Schoffelen RH, Hoop JG, Theunissen PH, Oosterhuis JW, vd Bijl H, et al. Multiparameter flow cytometry as a tool for the detection of micrometastatic tumour cells in the sentinel lymph node procedure of patients with breast cancer. *J Clin Pathol.* 2002 May;55(5):359-66.
254. Symmans WF, Liu J, Knowles DM, Inghirami G. Breast cancer heterogeneity: evaluation of clonality in primary and metastatic lesions. *Hum Pathol.* 1995 Feb;26(2):210-6.
255. Feichter GE, Kaufmann M, Muller A, Haag D, Eckhardt R, Goertler K. DNA index and cell cycle analysis of primary breast cancer and synchronous axillary lymph node metastases. *Breast Cancer Res Treat.* 1989 Jan;13(1):17-22.
256. Tsutsui S, Ohno S, Murakami S, Hachitanda Y, Oda S. Prognostic value of DNA ploidy in 653 Japanese women with node-negative breast cancer. *Int J Clin Oncol.* 2001 Aug;6(4):177-82.
257. Ewers SB, Langstrom E, Baldetorp B, Killander D. Flow-cytometric DNA analysis in primary breast carcinomas and clinicopathological correlations. *Cytometry.* 1984 Jul;5(4):408-19.
258. Kimmig R, Wimberger P, Kapsner T, Hillemanns P. Flow cytometric DNA analysis using cytokeratin labeling for identification of tumor cells in carcinomas of the breast and the female genital tract. *Anal Cell Pathol.* 2001;22(3):165-78.

259. Moll R, Krepler R, Franke WW. Complex cytokeratin polypeptide patterns observed in certain human carcinomas. *Differentiation*. 1983;23(3):256-69.
260. Trask DK, Band V, Zajchowski DA, Yaswen P, Suh T, Sager R. Keratins as markers that distinguish normal and tumor-derived mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Mar;87(6):2319-23.
261. Franzen B, Linder S, Alaiya AA, Eriksson E, Fujioka K, Bergman AC, et al. Analysis of polypeptide expression in benign and malignant human breast lesions. *Electrophoresis*. 1997 Mar-Apr;18(3-4):582-7.
262. Wingren S, Guerrieri C, Franlund B, Stal O. Loss of cytokeratins in breast cancer cells using multiparameter DNA flow cytometry is related to both cellular factors and preparation procedure. *Anal Cell Pathol*. 1995 Oct;9(3):229-33.
263. Meyer JS, Wittliff JL. Regional heterogeneity in breast carcinoma: thymidine labelling index, steroid hormone receptors, DNA ploidy. *Int J Cancer*. 1991 Jan 21;47(2):213-20.
264. Beerman H, Smit VT, Kluin PM, Bonsing BA, Hermans J, Cornelisse CJ. Flow cytometric analysis of DNA stemline heterogeneity in primary and metastatic breast cancer. *Cytometry*. 1991;12(2):147-54.
265. Prey MU, Meyer JS, Stone KR, McDivitt RW. Heterogeneity of breast carcinomas determined by flow cytometric analysis. *J Surg Oncol*. 1985 May;29(1):35-9.
266. Fuhr JE, Frye A, Kattine AA, Van Meter S. Flow cytometric determination of breast tumor heterogeneity. *Cancer*. 1991 Mar 1;67(5):1401-5.
267. Askensten UG, von Rosen AK, Nilsson RS, Auer GU. Intratumoral variations in DNA distribution patterns in mammary adenocarcinomas. *Cytometry*. 1989 May;10(3):326-33.
268. Ferno M, Baldetorp B, Ewers SB, Idvall I, Olsson H, Sigurdsson H, et al. One or multiple samplings for flow cytometric DNA analyses in breast cancer-prognostic implications? *Cytometry*. 1992;13(3):241-9.
269. Arnerlov C, Emdin SO, Cajander S, Bengtsson NO, Tavelin B, Roos G. Intratumoral variations in DNA ploidy and s-phase fraction in human breast cancer. *Anal Cell Pathol*. 2001;23(1):21-8.
270. Zhang Z, Weaver DL, Munjal K, Evans MF. Intratumoral DNA content heterogeneity in breast carcinomas demonstrated by core punch tissue sampling and flow cytometry. *J Clin Pathol*. 2014 Jun 18.
271. Beerman H, Bonsing BA, van de Vijver MJ, Hermans J, Kluin PM, Caspers RJ, et al. DNA ploidy of primary breast cancer and local recurrence after breast-conserving therapy. *Br J Cancer*. 1991 Jul;64(1):139-43.
272. Hupperets PS, Schutte B, van Assche C, Schouten LJ, Jager J, de Jong J, et al. Ploidy and S-phase fractions (SPF) of primary breast cancers and their nodal metastases. *Breast Cancer Res Treat*. 1994;32(2):197-202.
273. O'Reilly SM, Camplejohn RS, Barnes DM, Millis RR, Allen D, Rubens RD, et al. DNA index, S-phase fraction, histological grade and prognosis in breast cancer. *Br J Cancer*. 1990 May;61(5):671-4.
274. Masood S. Assessment of prognostic factors in breast fine-needle aspirates. *Am J Clin Pathol*. 2000 May;113(5 Suppl 1):S84-96.
275. Witzig TE, Ingle JN, Schaid DJ, Wold LE, Barlow JF, Gonchoroff NJ, et al. DNA ploidy and percent S-phase as prognostic factors in node-positive breast cancer: results from patients enrolled in two prospective randomized trials. *J Clin Oncol*. 1993 Feb;11(2):351-9.

276. Sigurdsson H, Baldetorp B, Borg A, Dalberg M, Ferno M, Killander D, et al. Indicators of prognosis in node-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 1990 Apr 12;322(15):1045-53.
277. Pinto AE, Andre S, Pereira T, Nobrega S, Soares J. Prognostic comparative study of S-phase fraction and Ki-67 index in breast carcinoma. *J Clin Pathol*. 2001 Jul;54(7):543-9.
278. Bezic J, Samija-Projic I, Projic P, Ljubkovic J, Capkun V, Tomic S. Can we identify the group of small invasive (T1a,b) breast cancers with minimal risk of axillary lymph node involvement? A pathohistological and DNA flow cytometric study. *Pathol Res Pract*. 2011 Jul 15;207(7):438-42.
279. Adeyinka A, Baldetorp B, Mertens F, Olsson H, Johannsson O, Heim S, et al. Comparative cytogenetic and DNA flow cytometric analysis of 242 primary breast carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet*. 2003 Nov;147(1):62-7.
280. Auer GU, Arrhenius E, Granberg PO, Fox CH. Comparison of DNA distributions in primary human breast cancers and their metastases. *Eur J Cancer*. 1980 Feb;16(2):273-8.
281. Torres L, Ribeiro FR, Pandis N, Andersen JA, Heim S, Teixeira MR. Intratumor genomic heterogeneity in breast cancer with clonal divergence between primary carcinomas and lymph node metastases. *Breast Cancer Res Treat*. 2007 Apr;102(2):143-55.
282. Brotherick I, Robson CN, Browell DA, Shenfine J, White MD, Cunliffe WJ, et al. Cytokeratin expression in breast cancer: phenotypic changes associated with disease progression. *Cytometry*. 1998 Aug 1;32(4):301-8.
283. Martin Jimenez M. Breast cancer in Spain. *Clin Transl Oncol*. 2006 Jul;8(7):461-2.
284. Noguchi M, Miyazaki I. Prognostic factors in breast-cancer and their controversies (review). *Oncol Rep*. 1994 Nov;1(6):1157-63.
285. Sakorafas GH, Peros G, Cataliotti L, Vlastos G. Lymphedema following axillary lymph node dissection for breast cancer. *Surg Oncol*. 2006 Nov;15(3):153-65.
286. Brar P, Jain S, Singh I. Complications of Axillary Lymph Node Dissection in Treatment of Early Breast Cancer: A Comparison of MRM and BCS. *Indian J Surg Oncol*. 2011 Jun;2(2):126-32.
287. Krag DN, Anderson SJ, Julian TB, Brown AM, Harlow SP, Ashikaga T, et al. Technical outcomes of sentinel-lymph-node resection and conventional axillary-lymph-node dissection in patients with clinically node-negative breast cancer: results from the NSABP B-32 randomised phase III trial. *Lancet Oncol*. 2007 Oct;8(10):881-8.
288. Krag DN, Anderson SJ, Julian TB, Brown AM, Harlow SP, Costantino JP, 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*. 2010 Oct;11(10):927-33.
289. Khakpour N, Hunt KK, Kuerer HM, Yi M, Meric-Bernstam F, Ross MI, et al. Sentinel lymph node dissection provides axillary control equal to complete axillary node dissection in breast cancer patients with lobular histology and a negative sentinel node. *Am J Surg*. 2005 Oct;190(4):598-601.
290. Weaver DL. Pathology evaluation of sentinel lymph nodes in breast cancer: protocol recommendations and rationale. *Mod Pathol*. 2010 May;23 Suppl 2:S26-32.
291. Bosari S, Lee AK, DeLellis RA, Wiley BD, Heatley GJ, Silverman ML. Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma. *Hum Pathol*. 1992 Jul;23(7):755-61.

292. Capdet J, Martel P, Charitansky H, Lim YK, Ferron G, Battle L, et al. Factors predicting the sentinel node metastases in T1 breast cancer tumor: an analysis of 1416 cases. *Eur J Surg Oncol*. 2009 Dec;35(12):1245-9.
293. Trudeau ME, Pritchard KI, Chapman JA, Hanna WM, Kahn HJ, Murray D, et al. Prognostic factors affecting the natural history of node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2005 Jan;89(1):35-45.
294. Shao MM, Chan SK, Yu AM, Lam CC, Tsang JY, Lui PC, et al. Keratin expression in breast cancers. *Virchows Arch*. 2012 Sep;461(3):313-22.
295. Joensuu H, Klemi PJ, Eerola E. Flow cytometric DNA analysis combined with fine needle aspiration biopsy in the diagnosis of palpable metastases. *Anal Quant Cytol Histol*. 1988 Aug;10(4):256-60.
296. Espinosa-Bravo M, Sansano I, Perez-Hoyos S, Ramos M, Sancho M, Xercavins J, 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*. 2013 Jul;39(7):766-73.
297. Remoundos DD, Ng VV, Wilson HA, Ahmed F, Chia Y, Cunnick GH. The use of one step nucleic acid amplification (OSNA) in clinical practice: a single-centre study. *Breast*. 2013 Apr;22(2):162-7.
298. Klingler S, Marchal F, Rauch P, Kenouchi O, Chretien AS, Genin P, et al. Using one-step nucleic acid amplification (OSNA) for intraoperative detection of lymph node metastasis in breast cancer patients avoids second surgery and accelerates initiation of adjuvant therapy. *Ann Oncol*. 2013 Sep;24(9):2305-9.
299. Guillen-Paredes MP, Carrasco-Gonzalez L, Chaves-Benito A, Campillo-Soto A, Carrillo A, Aguayo-Albasini JL. [One-step nucleic acid amplification (OSNA) assay for sentinel lymph node metastases as an alternative to conventional postoperative histology in breast cancer: A cost-benefit analysis]. *Cir Esp*. 2011 Aug-Sep;89(7):456-62.
300. Heilmann T, Mathiak M, Hofmann J, Mundhenke C, van Mackelenbergh M, Alkatout I, et al. Intra-operative use of one-step nucleic acid amplification (OSNA) for detection of the tumor load of sentinel lymph nodes in breast cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2013 Oct;139(10):1649-55.
301. Kumagai K, Yamamoto N, Miyashiro I, Tomita Y, Katai H, Kushima R, et al. Multicenter study evaluating the clinical performance of the OSNA assay for the molecular detection of lymph node metastases in gastric cancer patients. *Gastric Cancer*. 2014 Apr;17(2):273-80.
302. Chen YY, Schnitt SJ. Prognostic factors for patients with breast cancers 1cm and smaller. *Breast Cancer Res Treat*. 1998;51(3):209-25.
303. Mann GB, Port ER, Rizza C, Tan LK, Borgen PI, Van Zee KJ. Six-year follow-up of patients with microinvasive, T1a, and T1b breast carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 1999 Sep;6(6):591-8.
304. Cserni G, Amendoeira I, Apostolikas N, Bellocq JP, Bianchi S, Bussolati G, et al. 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*. 2003 Aug;39(12):1654-67.
305. Benson JR, della Rovere GQ. Management of the axilla in women with breast cancer. *Lancet Oncol*. 2007 Apr;8(4):331-48.
306. Krag DN. Current status of axillary lymph node dissection and sentinel node biopsy in breast cancer. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2010 Jul;8(7):471-3.

307. Gentilini O, Veronesi U. Abandoning sentinel lymph node biopsy in early breast cancer? A new trial in progress at the European Institute of Oncology of Milan (SOUND: Sentinel node vs Observation after axillary UltraSOUND). *Breast*. 2012 Oct;21(5):678-81.
308. Grube BJ, Giuliano AE. Observation of the breast cancer patient with a tumor-positive sentinel node: implications of the ACOSOG Z0011 trial. *Semin Surg Oncol*. 2001 Apr-May;20(3):230-7.
309. Cserni G. Sentinel lymph-node biopsy-based prediction of further breast cancer metastases in the axilla. *Eur J Surg Oncol*. 2001 Sep;27(6):532-8.
310. Abdessalam SF, Zervos EE, Prasad M, Farrar WB, Yee LD, Walker MJ, et al. Predictors of positive axillary lymph nodes after sentinel lymph node biopsy in breast cancer. *Am J Surg*. 2001 Oct;182(4):316-20.
311. Wong SL, Edwards MJ, Chao C, Tuttle TM, Noyes RD, Woo C, et al. Predicting the status of the nonsentinel axillary nodes: a multicenter study. *Arch Surg*. 2001 May;136(5):563-8.
312. Tabar L, Yen MF, Vitak B, Chen HH, Smith RA, Duffy SW. Mammography service screening and mortality in breast cancer patients: 20-year follow-up before and after introduction of screening. *Lancet*. 2003 Apr 26;361(9367):1405-10.
313. Tabar L, Dean PB. Thirty years of experience with mammography screening: a new approach to the diagnosis and treatment of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2008;10 Suppl 4:S3.
314. NIH consensus conference. Treatment of early-stage breast cancer. *JAMA*. 1991 Jan 16;265(3):391-5.
315. NIH Consensus Development Conference statement on the treatment of early-stage breast cancer. *Oncology (Williston Park)*. 1991 Feb;5(2):120-4.
316. Freedman LS, Edwards DN, McConnell EM, Downham DY. Histological grade and other prognostic factors in relation to survival of patients with breast cancer. *Br J Cancer*. 1979 Jul;40(1):44-55.
317. Saiz E, Toonkel R, Poppiti RJ, Jr., Robinson MJ. Infiltrating breast carcinoma smaller than 0.5 centimeters: is lymph node dissection necessary? *Cancer*. 1999 May 15;85(10):2206-11.
318. Bader AA, Tio J, Petru E, Buhner M, Pfahlberg A, Volkholz H, et al. T1 breast cancer: identification of patients at low risk of axillary lymph node metastases. *Breast Cancer Res Treat*. 2002 Nov;76(1):11-7.
319. Barth A, Craig PH, Silverstein MJ. Predictors of axillary lymph node metastases in patients with T1 breast carcinoma. *Cancer*. 1997 May 15;79(10):1918-22.
320. Chadha M, Axelrod D. Is axillary dissection always indicated in invasive breast cancer? *Oncology (Williston Park)*. 1997 Oct;11(10):1463-8; discussion 8, 73-9.
321. Zanon C, Durando A, Geuna M, Clara R, Moriglia A, Massobrio M, et al. Flow cytometry in breast cancer: prognostic and surgical indications of the sparing of axillary lymph node dissection. *Am J Clin Oncol*. 1998 Aug;21(4):392-7.
322. Mannweiler S, Tsybrovskyy O, Regauer S. The flow cytometric DNA index can predict the presence of lymph node metastases in invasive ductal breast carcinoma. *APMIS*. 2002 Aug;110(7-8):580-6.
323. Kallioniemi OP, Punnonen R, Mattila J, Lehtinen M, Koivula T. Prognostic significance of DNA index, multiploidy, and S-phase fraction in ovarian cancer. *Cancer*. 1988 Jan 15;61(2):334-9.

324. Gordon DJ, Resio B, Pellman D. Causes and consequences of aneuploidy in cancer. *Nat Rev Genet.* 2012 Mar;13(3):189-203.
325. Holland AJ, Cleveland DW. Losing balance: the origin and impact of aneuploidy in cancer. *EMBO Rep.* 2012 Jun;13(6):501-14.
326. Pavelka N, Rancati G, Li R. Dr Jekyll and Mr Hyde: role of aneuploidy in cellular adaptation and cancer. *Curr Opin Cell Biol.* 2010 Dec;22(6):809-15.
327. Sen S. Aneuploidy and cancer. *Curr Opin Oncol.* 2000 Jan;12(1):82-8.
328. Delaval B, Birnbaum D. A cell cycle hypothesis of cooperative oncogenesis (Review). *Int J Oncol.* 2007 May;30(5):1051-8.
329. Ottesen GL, Christensen IJ, Larsen JK, Kerndrup GB, Hansen B, Andersen JA. DNA aneuploidy in early breast cancer. *Br J Cancer.* 1995 Oct;72(4):832-9.
330. Furuya Y, Kawauchi Y, Fuse H. Cell proliferation, apoptosis and prognosis in patients with metastatic prostate cancer. *Anticancer Res.* 2003 Jan-Feb;23(1B):577-81.
331. Wenger CR, Clark GM. S-phase fraction and breast cancer--a decade of experience. *Breast Cancer Res Treat.* 1998;51(3):255-65.
332. Chadha M, Chabon AB, Friedmann P, Vikram B. Predictors of axillary lymph node metastases in patients with T1 breast cancer. A multivariate analysis. *Cancer.* 1994 Jan 15;73(2):350-3.
333. Hedley DW, Rugg CA, Gelber RD. Association of DNA index and S-phase fraction with prognosis of nodes positive early breast cancer. *Cancer Res.* 1987 Sep 1;47(17):4729-35.
334. Visscher DW, Zarbo RJ, Greenawald KA, Crissman JD. Prognostic significance of morphological parameters and flow cytometric DNA analysis in carcinoma of the breast. *Pathol Annu.* 1990;25 Pt 1:171-210.
335. Kallioniemi OP, Hietanen T, Mattila J, Lehtinen M, Lauslahti K, Koivula T. Aneuploid DNA content and high S-phase fraction of tumour cells are related to poor prognosis in patients with primary breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 1987 Mar;23(3):277-82.
336. Chassevent A, Jourdan ML, Romain S, Descotes F, Colonna M, Martin PM, et al. S-phase fraction and DNA ploidy in 633 T1T2 breast cancers: a standardized flow cytometric study. *Clin Cancer Res.* 2001 Apr;7(4):909-17.
337. Colozza M, Azambuja E, Cardoso F, Sotiriou C, Larsimont D, Piccart MJ. Proliferative markers as prognostic and predictive tools in early breast cancer: where are we now? *Ann Oncol.* 2005 Nov;16(11):1723-39.
338. Michels JJ, Duigou F, Marnay J. Flow cytometry in primary breast carcinomas. Prognostic impact of proliferative activity. *Breast Cancer Res Treat.* 2000 Jul;62(2):117-26.
339. Mandard AM, Denoux Y, Herlin P, Duigou F, van De Vijver MJ, Clahsen PC, et al. Prognostic value of DNA cytometry in 281 premenopausal patients with lymph node negative breast carcinoma randomized in a control trial: multivariate analysis with Ki-67 index, mitotic count, and microvessel density. *Cancer.* 2000 Oct 15;89(8):1748-57.
340. Malmstrom P, Bendahl PO, Boiesen P, Brunner N, Idvall I, Ferno M. S-phase fraction and urokinase plasminogen activator are better markers for distant recurrences than Nottingham Prognostic Index and histologic grade in a prospective study of premenopausal lymph node-negative breast cancer. *J Clin Oncol.* 2001 Apr 1;19(7):2010-9.

341. Pinto AE, Andre S, Soares J. Short-term significance of DNA ploidy and cell proliferation in breast carcinoma: a multivariate analysis of prognostic markers in a series of 308 patients. *J Clin Pathol*. 1999 Aug;52(8):604-11.
342. Harbeck N, Dettmar P, Thomssen C, Berger U, Ulm K, Kates R, et al. Risk-group discrimination in node-negative breast cancer using invasion and proliferation markers: 6-year median follow-up. *Br J Cancer*. 1999 May;80(3-4):419-26.
343. Collan YU, Eskelinen MJ, Nordling SA, Lipponen P, Pesonen E, Kumpusalo LM, et al. Prognostic studies in breast cancer. Multivariate combination of nodal status, proliferation index, tumor size, and DNA ploidy. *Acta Oncol*. 1994;33(8):873-8.
344. Lipponen P, Ji H, Aaltomaa S, Syrjanen S, Syrjanen K. p53 protein expression in breast cancer as related to histopathological characteristics and prognosis. *Int J Cancer*. 1993 Aug 19;55(1):51-6.
345. Haghbin M, McCue PA, Mansfield CM, Komarnicky LT, Benammar A, Schwartz GF. Correlation of flow cytometry to clinical factors, hormone receptors, and histopathological grade in stage I and II invasive breast carcinoma. *Am J Clin Oncol*. 1996 Feb;19(1):54-8.
346. Gazic B, Pizem J, Bracko M, Cufer T, Borstnar S, Pohar-Marinsek Z, et al. S-phase fraction determined on fine needle aspirates is an independent prognostic factor in breast cancer - a multivariate study of 770 patients. *Cytopathology*. 2008 Oct;19(5):294-302.
347. Michels JJ, Duigou F, Marnay J, Denoux Y, Delozier T, Chasle J. Flow cytometry in primary breast carcinomas: prognostic impact of multiploidy and hypoploidy. *Cytometry B Clin Cytom*. 2003 Sep;55(1):37-45.
348. Stal O, Carstensen J, Hatschek T, Nordenskjold B. Significance of S-phase fraction and hormone receptor content in the management of young breast cancer patients. *Br J Cancer*. 1992 Oct;66(4):706-11.
349. Stal O, Brisfors A, Carstensen J, Ferraud L, Hatschek T, Nordenskjold B. Interrelations between cellular DNA content, S-phase fraction, hormone receptor status and age in primary breast cancer. A series of 1,342 consecutively detected tumors. South-East Sweden Breast Cancer Group. *Acta Oncol*. 1992;31(3):283-92.
350. Stal O, Brisfors A, Carstensen J, Ferraud L, Hatschek T, Nordenskjold B. Relationships of DNA ploidy, S-phase fraction and hormone receptor status to tumor stage in breast cancers detected by population screening. The South-East Sweden Breast Cancer Group. *Int J Cancer*. 1992 Apr 22;51(1):28-33.
351. Chavez-Uribe E, Cameselle-Teijeiro J, Vinuela JE, Castro-Pineiro C, Gude F, Forteza J, et al. Hypoploidy defines patients with poor prognosis in breast cancer. *Oncol Rep*. 2007 May;17(5):1109-14.
352. Arnerlov C, Emdin SO, Lundgren B, Roos G, Soderstrom J, Bjersing L, et al. Mammographic growth rate, DNA ploidy, and S-phase fraction analysis in breast carcinoma. A prognostic evaluation in a screened population. *Cancer*. 1992 Oct 1;70(7):1935-42.
353. Bosari S, Lee AK, Tahan SR, Fighi MA, Wiley BD, Heatley GJ, et al. DNA flow cytometric analysis and prognosis of axillary lymph node-negative breast carcinoma. *Cancer*. 1992 Oct 1;70(7):1943-50.
354. Gnant MF, Blijham G, Reiner A, Reiner G, Reynders M, Schutte B, et al. DNA ploidy and other results of DNA flow cytometry as prognostic factors in operable breast cancer: 10 year results of a randomised study. *Eur J Cancer*. 1992;28(2-3):711-6.

355. Thorud E, Fossa SD, Vaage S, Kaalhus O, Knudsen OS, Borner O, et al. Primary breast cancer. Flow cytometric DNA pattern in relation to clinical and histopathologic characteristics. *Cancer*. 1986 Feb 15;57(4):808-11.
356. Arnerlov C, Emdin SO, Lundgren B, Roos G, Soderstrom J, Bjersing L, et al. Breast carcinoma growth rate described by mammographic doubling time and S-phase fraction. Correlations to clinical and histopathologic factors in a screened population. *Cancer*. 1992 Oct 1;70(7):1928-34.
357. Schmidt H, Wei JP, Yeh KA. Predictive value of flow cytometry for metastatic potential in breast cancer. *Am Surg*. 1999 May;65(5):434-8.
358. Taylor IW, Musgrove EA, Friedlander ML, Foo MS, Hedley DW. The influence of age on the DNA ploidy levels of breast tumours. *Eur J Cancer Clin Oncol*. 1983 May;19(5):623-8.
359. Keyhani-Rofagha S, O'Toole RV, Farrar WB, Sickie-Santanello B, DeCenzo J, Young D. Is DNA ploidy an independent prognostic indicator in infiltrative node-negative breast adenocarcinoma? *Cancer*. 1990 Apr 1;65(7):1577-82.
360. Hatschek T, Fagerberg G, Stal O, Sullivan S, Carstensen J, Grontoft O, et al. Cytometric characterization and clinical course of breast cancer diagnosed in a population-based screening program. *Cancer*. 1989 Sep 1;64(5):1074-81.
361. Stal O, Dufmats M, Hatschek T, Carstensen J, Klintonberg C, Rutqvist LE, et al. S-phase fraction is a prognostic factor in stage I breast carcinoma. *J Clin Oncol*. 1993 Sep;11(9):1717-22.
362. Dressler LG, Seamer LC, Owens MA, Clark GM, McGuire WL. DNA flow cytometry and prognostic factors in 1331 frozen breast cancer specimens. *Cancer*. 1988 Feb 1;61(3):420-7.
363. Toikkanen S, Joensuu H, Klemi P. The prognostic significance of nuclear DNA content in invasive breast cancer--a study with long-term follow-up. *Br J Cancer*. 1989 Nov;60(5):693-700.
364. Ewers SB, Attewell R, Baldetorp B, Borg A, Langstrom E, Killander D. Prognostic potential of flow cytometric S-phase and ploidy prospectively determined in primary breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat*. 1992 Jan;20(2):93-108.
365. Lipponen P, Aaltomaa S, Eskelinen M, Kosma VM, Marin S, Syrjanen K. The changing importance of prognostic factors in breast cancer during long-term follow-up. *Int J Cancer*. 1992 Jul 9;51(5):698-702.
366. Gasparini G, Weidner N, Bevilacqua P, Maluta S, Dalla Palma P, Caffo O, et al. Tumor microvessel density, p53 expression, tumor size, and peritumoral lymphatic vessel invasion are relevant prognostic markers in node-negative breast carcinoma. *J Clin Oncol*. 1994 Mar;12(3):454-66.
367. Fisher B, Gunduz N, Costantino J, Fisher ER, Redmond C, Mamounas EP, et al. DNA flow cytometric analysis of primary operable breast cancer. Relation of ploidy and S-phase fraction to outcome of patients in NSABP B-04. *Cancer*. 1991 Oct 1;68(7):1465-75.
368. Rosanelli GP, Steindorfer P, Wirnsberger GH, Klimpfinger M, Ratschek M, Puerstner P, et al. Mutant p53 expression and DNA analysis in human breast cancer comparison with conventional clinicopathological parameters. *Anticancer Res*. 1995 Mar-Apr;15(2):581-6.
369. Duigou F, Herlin P, Marnay J, Michels JJ. Variation of flow cytometric DNA measurement in 1,485 primary breast carcinomas according to guidelines for DNA histogram interpretation. *Cytometry*. 2000 Feb 15;42(1):35-42.
370. Lacroix M, Toillon RA, Leclercq G. p53 and breast cancer, an update. *Endocr Relat Cancer*. 2006 Jun;13(2):293-325.

371. Zapardiel Gutierrez I. Factores moleculares pronósticos relacionados con el control del ciclo celular en el cáncer de mama. Situación actual. *Clin Invest Gin Obst* 2009;36(01).
372. Olivier M, Langerod A, Carrieri P, Bergh J, Klaar S, Eyfjord J, et al. The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2006 Feb 15;12(4):1157-67.
373. Elledge RM, Fuqua SA, Clark GM, Pujol P, Allred DC. William L. McGuire Memorial Symposium. The role and prognostic significance of p53 gene alterations in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 1993;27(1-2):95-102.
374. Elledge RM, Fuqua SA, Clark GM, Pujol P, Allred DC, McGuire WL. Prognostic significance of p53 gene alterations in node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 1993;26(3):225-35.
375. Ferrero JM, Ramaioli A, Formento JL, Francoual M, Etienne MC, Peyrottes I, et al. P53 determination alongside classical prognostic factors in node-negative breast cancer: an evaluation at more than 10-year follow-up. *Ann Oncol*. 2000 Apr;11(4):393-7.
376. Rudolph P, Alm P, Olsson H, Heidebrecht HJ, Ferno M, Baldetorp B, et al. Concurrent overexpression of p53 and c-erbB-2 correlates with accelerated cycling and concomitant poor prognosis in node-negative breast cancer. *Hum Pathol*. 2001 Mar;32(3):311-9.
377. Viani GA, Afonso SL, Stefano EJ, De Fendi LI, Soares FV. Adjuvant trastuzumab in the treatment of her-2-positive early breast cancer: a meta-analysis of published randomized trials. *BMC Cancer*. 2007;7:153.
378. Kaptain S, Tan LK, Chen B. Her-2/neu and breast cancer. *Diagn Mol Pathol*. 2001 Sep;10(3):139-52.
379. Korkolis D, Ardavanis A, Yotis J, Kyroudi A, Gorgoulis V, Kittas C. HER-2/neu overexpression in breast cancer: an immunohistochemical study including correlations with clinicopathologic parameters, p53 oncoprotein and cathepsin-D. *Anticancer Res*. 2001 May-Jun;21(3C):2207-12.
380. Houston SJ, Plunkett TA, Barnes DM, Smith P, Rubens RD, Miles DW. Overexpression of c-erbB2 is an independent marker of resistance to endocrine therapy in advanced breast cancer. *Br J Cancer*. 1999 Mar;79(7-8):1220-6.
381. Bergh J, Jonsson PE, Glimelius B, Nygren P. A systematic overview of chemotherapy effects in breast cancer. *Acta Oncol*. 2001;40(2-3):253-81.
382. Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet*. 1998 Sep 19;352(9132):930-42.
383. Clarke MJ. WITHDRAWN: Multi-agent chemotherapy for early breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008(4):CD000487.
384. Fisher B, Bryant J, Dignam JJ, Wickerham DL, Mamounas EP, Fisher ER, et al. Tamoxifen, radiation therapy, or both for prevention of ipsilateral breast tumor recurrence after lumpectomy in women with invasive breast cancers of one centimeter or less. *J Clin Oncol*. 2002 Oct 15;20(20):4141-9.
385. Veronesi U, Viale G, Rotmensz N, Goldhirsch A. Rethinking TNM: breast cancer TNM classification for treatment decision-making and research. *Breast*. 2006 Feb;15(1):3-8.
386. Ocon Hernandez O, Fernandez Cabrera MF, Perez Vicente S, Davila Arias C, Exposito Hernandez J, Olea Serrano N. [Breast cancer survival after 10 years of follow up, in Granada and Almeria Spanish Provinces]. *Rev Esp Salud Publica*. 2010 Nov-Dec;84(6):705-15.

387. Vielh P, Carton M, Padoy E, de Rycke Y, Klijanienko J, El-Naggar AK, et al. S-phase fraction as an independent prognostic factor of long-term overall survival in patients with early-stage or locally advanced invasive breast carcinoma. *Cancer*. 2005 Dec 25;105(6):476-82.
388. Camplejohn RS, Ash CM, Gillett CE, Raikundalia B, Barnes DM, Gregory WM, et al. The prognostic significance of DNA flow cytometry in breast cancer: results from 881 patients treated in a single centre. *Br J Cancer*. 1995 Jan;71(1):140-5.
389. Michels JJ, Duigou F, Marnay J, Henry-Amar M, Delozier T, Denoux Y, et al. Flow cytometry and quantitative immunohistochemical study of cell cycle regulation proteins in invasive breast carcinoma: prognostic significance. *Cancer*. 2003 Mar 15;97(6):1376-86.
390. Cornelisse CJ, van de Velde CJ, Caspers RJ, Moolenaar AJ, Hermans J. DNA ploidy and survival in breast cancer patients. *Cytometry*. 1987 Mar;8(2):225-34.
391. Bracko M, Us-Krasovec M, Cufer T, Lamovec J, Zidar A, Goehde W. Prognostic significance of DNA ploidy determined by high-resolution flow cytometry in breast carcinoma. *Anal Quant Cytol Histol*. 2001 Feb;23(1):56-66.
392. Beerman H, Kluin PM, Hermans J, van de Velde CJ, Cornelisse CJ. Prognostic significance of DNA-ploidy in a series of 690 primary breast cancer patients. *Int J Cancer*. 1990 Jan 15;45(1):34-9.
393. Bergers E, van Diest PJ, Baak JP. Cell cycle analysis of 932 flow cytometric DNA histograms of fresh frozen breast carcinoma material. Correlations between flow cytometric, clinical, and pathologic variables. MMMCP Collaborative Group. Multicenter Morphometric Mammary Carcinoma Project Collaborative Group. *Cancer*. 1996 Jun 1;77(11):2258-66.
394. Stanton PD, Cooke TG, Oakes SJ, Winstanley J, Holt S, George WD, et al. Lack of prognostic significance of DNA ploidy and S phase fraction in breast cancer. *Br J Cancer*. 1992 Nov;66(5):925-9.
395. Harbeck N, Dettmar P, Thomssen C, Henselmann B, Kuhn W, Ulm K, et al. Prognostic impact of tumor biological factors on survival in node-negative breast cancer. *Anticancer Res*. 1998 May-Jun;18(3C):2187-97.
396. Reed DN, Jr., Johnson J, Richard P, McCormick S, Shannon N, Mikhail RA, et al. DNA flow cytometry does not predict 5- or 10-year recurrence rates for T1-2 node-negative breast cancer. *Arch Surg*. 2000 Dec;135(12):1422-6.
397. Muss HB, Kute TE, Case LD, Smith LR, Booher C, Long R, et al. The relation of flow cytometry to clinical and biologic characteristics in women with node negative primary breast cancer. *Cancer*. 1989 Nov 1;64(9):1894-900.
398. Clark GM, Dressler LG, Owens MA, Pounds G, Oldaker T, McGuire WL. Prediction of relapse or survival in patients with node-negative breast cancer by DNA flow cytometry. *N Engl J Med*. 1989 Mar 9;320(10):627-33.