



TESIS DOCTORAL

**VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA MOLECULAR EN EL
GANGLIO CENTINELA EN CÁNCER DE MAMA Y LA
IMPLICACIÓN DE LA CARGA TUMORAL EN EL MANEJO
QUIRÚRGICO DE LA AXILA**

Martín Espinosa-Bravo

Dirección de Tesis: Doctora Isabel T. Rubio Rodríguez y
Profesor Jordi Xercavins Montosa.

Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología,
Medicina Preventiva y Salud Pública.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BARCELONA

Barcelona 2014



TESIS DOCTORAL

**VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA MOLECULAR EN EL
GANGLIO CENTINELA EN CÁNCER DE MAMA Y LA
IMPLICACIÓN DE LA CARGA TUMORAL EN EL MANEJO
QUIRÚRGICO DE LA AXILA**

Tesis doctoral presentada por

Martín Espinosa-Bravo

para optar al grado académico de

DOCTOR EN MEDICINA

Trabajo realizado en la Unidad de Patología Mamaria del Centro de Cáncer de
Mama “Endavant i de cara” del Hospital Universitario Vall d’Hebron bajo la
dirección de

Dra. Isabel T. Rubio Rodríguez
Profesor Jordi Xercavins Montosa

Tesis adscrita al Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología, Medicina
Preventiva y Salud Pública de la Universidad Autónoma de Barcelona dentro del
programa de doctorado en Pediatría, Obstetricia y Ginecología, Medicina
Preventiva y Salud Pública.

Martín Espinosa-Bravo

Dra. Isabel T. Rubio
Rodríguez

Profesor Jordi
Xercavins Montosa

Mayo 2014

Para Ro, Mateo y Telmo.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Isabel Rubio Rodríguez y al Profesor Jordi Xercavins Montosa, directores de esta tesis, maestros y mentores que me han inspirado y guiado en su confección; gracias por vuestra confianza y apoyo incondicional en mi desarrollo profesional. Sólo los auténticos líderes no tienen miedo a la diferencia, a lo establecido y afianzan la autoestima de los que le siguen y les hacen sentir capaces de mucho más que lo que piensa uno mismo.

Al Profesor Lluís Cabero i Roura por su confianza y rigor en el desarrollo científico.

Al Dr. Antonio Gil Moreno, Jefe del Servicio de Ginecología del Hospital Universitario Vall d'Hebron, por su apoyo y confianza en el trabajo diario.

A los Dres. Vicente Peg y Manuel Ramos por estar siempre disponibles, y por vuestro apoyo y generosa contribución en el desarrollo del trabajo.

A las pacientes que participan en esta tesis y dan sentido al estudio.

A mis compañeros de la Unidad de Patología Mamaria, los Dres. Córdoba, Cortadellas, Rodríguez, Esgueva y Díaz Botero; por compartir conmigo el día a día.

A Augusto Sao y Santiago Pérez-Hoyos por vuestra valiosa ayuda en la integración de los registros.

Al Profesor Josep M^a Lailla Vicens por su influencia y apoyo para realizar el doctorado que se plasma con esta tesis; y con él, a todo el equipo del Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital San Joan de Déu de Barcelona, donde me he formado como Médico Interno Residente, y en particular a la Dra. M^a Dolores Gómez Roig y el Dr. Sergi Cabré, quienes han sabido acompañarme y guiarme en esta segunda etapa tan importante de mi carrera.

A los Dres. Legáz, Barrionuevo, Landini y Hernández por vuestro apoyo diario incondicional, no solo personal, sino familiar; y por estar siempre dispuestos a ayudarnos en todo lo que necesitemos.

Un especial agradecimiento a la Dra. Castagno por su lectura inteligente y de contraste de opiniones, y por su sabia aportación.

A mis padres y hermanos por el esfuerzo realizado durante tantos años de estudio.

A Ro, Mateo y Telmo por acompañarme y apoyarme día a día en esta empresa; y esperarme siempre con los brazos abiertos. Sois los que cargáis estas baterías que parecen no agotarse con el paso del tiempo...

Monsieur le Docteur Gwenaël FERRON

Chirurgien Oncologue
Institut Claudius Regaud

J'ai une très grande admiration pour tes talents de chirurgien, ta capacité de travail et pour la simplicité avec laquelle tu sais partager l'étendue de tes connaissances.

Je n'en suis moins admiratif quant à tes talents de père de famille.

Sache que je suis très honoré d'avoir partagé ma formation avec toi en tant que maître chirurgical ainsi qu'une amitié qui perdure malgré la distance.

Monsieur le Docteur Pierre MARTEL

Chirurgien Oncologue
Institut Claudius Regaud

La formation chirurgicale connaît des moments privilégiés.

Votre maîtrise chirurgicale et votre sens humain m'ont beaucoup appris.

Monsieur le Professeur Denis QUERLEU

Chirurgien Oncologue
Institut Claudius Regaud

Vous m'avez accueilli avec gentillesse dans votre service où l'interne étranger tient une place toute privilégiée, basée sur la confiance. J'ai pris conscience là des qualités indispensables à la bonne pratique chirurgicale, la rigueur, la connaissance, le dévouement.

LISTADO DE ABREVIATURAS

AJCC	American Joint Committee on Cancer
ALND	Axillary lymph node dissection
ARNm	Acido Ribonucleico mensajero
AUC	Area Under the Curve, área bajo la curva
BSGC	Biopsia Selectiva del Ganglio Centinela
CK19	Citoqueratina 19
CTA	Células tumorales aisladas
GC	Ganglio centinela
GnoC	Ganglios no centinela
H&E	Hematoxilina y eosina
Her2/Neu	Receptor tyrosine-protein-kinasa erbB-2
HR	Hazard ratio
IC	Intervalo de confianza
IHQ	Técnica de Inmunohistoquímica
ILV	Invasión linfovascular
IQR	Interquartile
LA	Linfadenectomía axilar
mm.	Milímetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
OSNA	One Step Nucleic Acid Amplification
PAAF	Punción aspiración con aguja fina
RH	Receptores hormonales
ROC	Receiver Operating Characteristic
SLN	Sentinel Lymph Node
SPECT-TAC	Single-photon emission computed tomography
TAB	Tissue allocation bias
TConv	Técnica convencional
TTL	Total Tumoral Load, Carga tumoral total

ÍNDICE

Índice de figuras, tablas y gráficos.....	I
RESUMEN.....	V
ABSTRACT.....	X
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.2 Tratamiento local del cáncer de mama.....	3
1.2.1 La linfadenectomía axilar.....	3
1.2.2 Complicaciones de la linfadenectomía axilar.....	8
1.2.3 Biopsia selectiva del ganglio centinela.....	11
1.2.4 Rol del GC en la estadificación axilar.....	13
1.2.5 Reducción de la morbilidad axilar.....	15
1.3 Estudio anatomopatológico del GC.....	16
1.3.1 Estudio intraoperatorio del GC.....	17
1.3.2 Estudio anatomopatológico definitivo del GC.....	21
1.4 Discrepancias en el estudio intraoperatorio del GC.....	23
1.5 La técnica OSNA.....	24
1.6 Estudios de validación de la técnica OSNA.....	27
1.7 Predicción de afectación axilar después de un GC positivo.....	33
1.8 Incorporación de la expresión génica del tumor primario en la cirugía	36
1.9 Concepto de la carga tumoral.....	37
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	38
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	42
3.1 Tipo de estudio.....	43
3.2 Primera Fase (F1).....	44
3.2.1 Criterios de inclusión F1.....	44
3.2.2 Criterios de exclusión F1.....	44
3.2.3 Técnica de biopsia selectiva del ganglio centinela	45
3.2.4 Estudio anatomopatológico de los ganglios centinela y axilares.....	46
3.2.5 Estudio anatomopatológico del tumor de mama	49
3.3 Segunda Fase (F2).....	50
3.3.1 Criterios de inclusión F2.....	50
3.3.2 Criterios de exclusión F2.....	50
3.3.3 Técnica de biopsia selectiva del ganglio centinela	50
3.3.4 Estudio mediante OSNA de los ganglios centinela	50
3.3.5 Estudio histológico de la linfadenectomía axilar	51
3.3.6 Estudio anatomopatológico del tumor de mama	51
3.3.7 Cálculo de la carga tumoral total.....	51
3.3.8 Clasificación de subtipos moleculares intrínsecos.....	51
3.4 Análisis estadístico.....	52
4. RESULTADOS.....	54
4.1 RESULTADOS DE LA PRIMERA FASE (F1).....	55
4.1.1 Características generales de la población F1.....	56
4.1.2 Estado de los ganglios centinela.....	58
4.1.3 Momento de la realización de linfadenectomía axilar complementaria.....	60
4.1.4 Análisis de la discordancia del estudio intraoperatorio y diferido de	

la técnica convencional.....	61
4.1.5 Estado de los ganglios en la linfadenectomía complementaria.....	62
4.1.6 Estado de los ganglios axilares según el TNM.....	62
4.1.7 Distribución de los subtipos moleculares.....	63
4.2 RESULTADOS DE LA SEGUNDAFASE (F2).....	65
4.2.1 Características generales de la población F2.....	66
4.2.2 Características de la población según el estatus del GC por OSNA..	66
4.2.3 Análisis de los ganglios centinela según la técnica OSNA.....	69
4.2.4 Análisis de los GnoC de la linfadenectomía axilar.....	70
4.2.5 Características de la población según estatus de los GnoC en la linfadenectomía axilar.....	71
4.2.6 Análisis de las características de los ganglios centinela según el compromiso de los GnoC en la linfadenectomía axilar.....	74
4.2.7 Análisis de regresión logística de la afectación de los GnoC en la linfadenectomía	75
4.2.7.1 Estudio univariado.....	75
4.2.7.2 Estudio multivariado.....	78
4.2.8 Determinación del punto de corte de la carga tumoral total.....	79
4.2.9 Repercusión del punto de corte de la carga tumoral total establecido	81
5. DISCUSIÓN.....	83
5.1 Estandarización del estudio anatomopatológico del ganglio centinela: pri- mera ventaja de la técnica OSNA.....	85
5.2 Resultado definitivo intraoperatorio: segunda ventaja de la técnica OSNA	87
5.3 Desventajas de la técnica OSNA.....	88
5.4 Implicaciones de la carga tumoral total.....	91
5.5 Perspectiva actual sobre la linfadenectomía axilar en el cáncer de mama precoz.....	94
5.6 La Carga Tumoral Total como herramienta de predicción.....	98
5.7 Influencia de la expresión génica del tumor primario en la disección axilar	100
6. CONCLUSIONES.....	101
7. BIBLIOGRAFIA.....	105
8. ANEXOS.....	126
8.1 Anexo 1: TNM.....	127
8.2 Anexo 2: Tipos histológicos de la OMS.....	128
8.3 Anexo 3: Tabla de curva de predicción en la población total.....	129
8.4 Anexo 4: Tabla de curva de predicción en la población con receptores hormonales positivos.....	130

ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y GRÁFICOS

FIGURAS

Figura 1	Incidencia acumulada de recidiva local o regional.....	5
Figura 2	Supervivencia libre de enfermedad a distancia	5
Figura 3	Análisis Bayesiano del beneficio de sobrevida.....	7
Figura 4	Supervivencia libre de enfermedad según cantidad de ganglios axilares afectos.....	8
Figura 5	Técnicas de estudio anatomopatológico intraoperatorio del ganglio centinela mediante cortes por congelación.....	17
Figura 6	Preparación de un ganglio centinela después de su corte y fijación en parafina.....	19
Figura 7	Técnicas de estudio anatomopatológico intraoperatorio del ganglio centinela mediante impronta citológica.....	20
Figura 8	Técnica OSNA.....	24
Figura 9	Técnica OSNA. Captura de pantalla de la RD.100i.....	26
Figura 10	Técnica OSNA. Captura de pantalla del ordenador adaptado a la RD.100i.....	27
Figura 11	Técnica de validación de la técnica OSNA	28

TABLAS

Tabla I	Resultados de las diferentes series de validación de la técnica OSNA.....	30
Tabla II - F1	Características generales de la cohorte de pacientes que compara la técnica convencional con la técnica OSNA en el estudio intraoperatorio del GC.....	57
Tabla III - F1	Características de los ganglios centinela de la cohorte de pacientes que compara la técnica convencional con la técnica OSNA.....	59
Tabla IV - F1	Análisis de discordancia en la cohorte de pacientes de técnica convencional según resultado intraoperatorio y diferido del ganglio centinela.....	61
Tabla V - F1	Características de las linfadenectomías complementarias de la cohorte de pacientes que compara la técnica convencional con la técnica OSNA.....	62

Tabla VI - F1	Características del estatus ganglionar de la cohorte de pacientes que compara la técnica convencional con la técnica OSNA.....	63
Tabla VII - F1	Subtipos moleculares de la cohorte de pacientes que compara la técnica convencional con la técnica OSNA en el estudio intraoperatorio del GC.....	64
Tabla VIII - F2	Características de la cohorte de pacientes con estudio intraoperatorio del GC con la técnica OSNA según el resultado positivo o negativo del mismo.....	68
Tabla IX - F2	Características de los ganglios centinela de la cohorte de pacientes estudiada mediante la técnica OSNA.....	70
Tabla X - F2	Características del estatus ganglionar de la cohorte de pacientes estudiada con la técnica OSNA.....	71
Tabla XI - F2	Características de los ganglios no centinela según fueran negativos o positivos de las linfadenectomías realizadas después de GC positivo.....	73
Tabla XII - F2	Características de los ganglios centinela afectados según el estado de los ganglios no centinela de las linfadenectomías complementarias.....	75
Tabla XIII - F2	Estudio univariado en relación de la presencia de GnoC positivos en la LA después de GC positivos por OSNA.....	76
Tabla XIV - F2	Estudio multivariado en relación de la presencia de GnoC positivos en la LA después de GC positivos.....	79

GRÁFICOS

Gráfico I - F1	Box plot de la cantidad de ganglios centinela extraídos en la cohorte de casos (OSNA) y la cohorte control (CONV) ..	58
Gráfico II - F2	Diagrama de barras (Bar-Plot) del estudio de regresión logística en relación de la presencia de GnoC positivos en la LA complementaria después de GC positivos por la técnica OSNA.....	77
Gráfico III - F2	Diagrama de barras (Bar-Plot) y de cajas (Box-Plot) del estudio de regresión logística del tipo metástasis y la TTL en relación de la presencia de GnoC positivos en la LA complementaria después de GC positivos por OSNA.....	78
Gráfico IV - F2	Área bajo la curva ROC de la carga tumoral total.....	80

Gráfico V - F2	Probabilidad de que los pacientes incluidos tengan ganglios no centinela afectados según la sensibilidad y especificidad de los valores de TTL.....	80
-----------------------	---	----

RESUMEN

Introducción: La biopsia del ganglio centinela (GC) es actualmente el procedimiento estándar para la estadificación axilar del cáncer de mama en estadios precoces, lo que permite reducir la morbilidad de la linfadenectomía axilar (LA). La incidencia de afectación tumoral de ganglios linfáticos axilares no centinela cuando el GC es positivo varía entre 40-60%. En pacientes con ganglio centinela positivo numerosos estudios han reportado los factores de riesgo que influyen en la afectación del resto de ganglios axilares para determinar qué pacientes con ganglio centinela positivo pueden evitar una LA. Se ha demostrado que uno de estos factores es el tamaño de las metástasis en el ganglio centinela determinado mediante la histología convencional. Sin embargo, el examen histopatológico del GC varía considerablemente y no está estandarizado. Recientemente se han introducido técnicas moleculares para el estudio intraoperatorio de los GCs como alternativa al estudio patológico convencional. La técnica molecular denominada One Step Nucleic Acid Amplification (OSNA) permite detectar metástasis en el GC mediante la determinación cuantitativa de la expresión del ARNm de la citoqueratina 19 (CK-19).

El objetivo de este estudio es determinar si la técnica OSNA para la detección intraoperatoria de ganglios linfáticos metastásicos es comparable a la histopatología convencional (primera fase); y cuantificar la carga tumoral total (TTL) en los GC positivos evaluados por la técnica OSNA y determinar si esta TTL predice la presencia de metástasis en ganglios no centinela (segunda fase) en pacientes con estadios precoces cáncer de mama.

Material y métodos: En la primera fase se analizó una cohorte de 609 pacientes con cáncer de mama diagnosticados en 2009 y 2010 en dos centros españoles. El estudio intraoperatorio del GC se llevó a cabo mediante el estudio histopatológico convencional en 303 pacientes y mediante la técnica OSNA en 306 pacientes. Las características de los pacientes se evaluaron en ambos grupos y se compararon las tasas de metástasis detectadas por ambos métodos. En la segunda fase se incluyeron 306 pacientes con cáncer invasivo de mama estadio cT1-3 cN0 en las cuales la evaluación intraoperatoria del GC se realizó mediante la técnica OSNA.

La TTL se definió como la sumatoria de copias de ARNm de CK19 cada GC positivo.

Resultados de la primera fase: Al comparar la técnica OSNA con la histología convencional, en el estudio definitivo se detectaron 100 GCs metastásicos en el grupo de estudio convencional (47 macrometástasis y 33 micrometástasis), en comparación con los 142 GC positivos (61 macrometástasis y 47 micrometástasis) en el grupo OSNA, diferencias no estadísticamente significativas ($p=0,17$). La afectación de los GC se detectó en 80 pacientes (26.4%) mediante la histología convencional y en 108 (35.3%) por la técnica OSNA ($p=0,11$). La LA después de un resultado positivo del GC se realizó en 185 pacientes, en 108 (35.8%) en el grupo OSNA y en 77 pacientes (25.4%) en el grupo de histología convencional.

En todos los pacientes de la técnica OSNA la LA complementaria se realizó en el mismo acto quirúrgico; mientras que en el grupo de estudio convencional del GC, sólo en 50 pacientes (64.9%) la LA se realizó en la misma cirugía y en 27 pacientes (35,1%) se realizó en una segunda intervención quirúrgica ($p<0,001$). En el grupo de la técnica patológica convencional con LA en la misma cirugía, 42 pacientes (84%) tuvieron macrometástasis en el GC y 8 pacientes (16%) micrometástasis en el GC. Mientras que de los pacientes con la LA en una segunda cirugía por falso negativo del estudio intraoperatorio convencional, 5 pacientes (18,5%) tuvieron una macrometástasis y 22 (el 81,5%) tuvieron una micrometástasis en el estudio de anatomía patológica definitivo.

Resultados de la segunda fase: La TTL actúa como factor predictivo de metástasis de ganglios no centinela en la LA complementaria, con un OR 1,67 (IC 95 %: 1,18 – 2,35). En el análisis multivariado, la TTL es un predictor de metástasis de ganglios no centinela en pacientes con receptores hormonales positivos con OR 1,69 (IC del 95%: 1,19 – 2,41), $p<0,003$. En nuestra cohorte de pacientes, con una TTL $1,2 \times 10^5$ copias/ml, se determinó una especificidad del 85,3% y un valor predictivo negativo de 80%. Si tenemos en cuenta sólo los

pacientes con receptores hormonales positivos, con una TTL $\leq 5 \times 10^5$ copias/ml la especificidad es del 86,7% y un valor predictivo negativo del 83,7%.

Conclusiones: La técnica OSNA puede detectar metástasis del GC de forma estandarizada sin aumento en la detección de GCs positivos y sin falsos negativos comparado con la técnica anatomopatológica convencional. Es un método nuevo de evaluación del GC en pacientes con cáncer de mama que reduce la necesidad de una segunda cirugía en el 35,1% de los pacientes con estadios precoces de la enfermedad que presentan ganglio centinela positivo. La TTL determinada en los GC mediante la técnica OSNA predice metástasis adicionales de ganglios no centinela en la axila y puede guiar las decisiones sobre la realización de una LA complementaria en pacientes con cáncer de mama y ganglio centinela positivo.

ABSTRACT

Introduction: The sentinel node (SLN) is currently the standard procedure for axillary staging of breast cancer in early stages, reducing the morbidity of axillary lymph node dissection (ALND). When the SLN is positive the incidence of tumor involvement of non-sentinel axillary lymph nodes varies between 40-60 %. Numerous studies have reported the risk factors that influence the allocation of the remaining axillary nodes to determine which patients with positive SLN can avoid an ALND. One of them is the SLN metastasis size by conventional histology. However, histopathological examination of SLN varies considerably and is not standardized. Recently, molecular techniques have been introduced for intraoperative study of SLN as an alternative to conventional pathological study. The OSNA assay (One Step Nucleic Acid Amplification) is a molecular technique of SLN metastases by quantitation of mRNA expression of cytokeratin 19 (CK19).

The aim of this study was to determine whether intraoperative OSNA technique for detection of metastatic lymph nodes is comparable to conventional histopathology (first phase); and to quantify the total tumor load (TTL) of the positive SLN assessed by OSNA and to determine if this TTL predicts the presence of non-SLN metastases in patients with early stage breast cancer (second phase).

Material and methods: In the first phase a cohort of 609 patients with breast cancer diagnosed in 2009-10 in two Spanish centers was analyzed. Intraoperative study of SLN was carried out by conventional histopathological in 303 patients and by OSNA assay in 306 patients. Patients characteristics in both groups were evaluated and metastasis rates detected by both methods were compared. 306 patients with invasive breast cancer cT1-3 cN0 stage in which SLN intraoperative assessment was performed by OSNA technique were included in the second phase. The TTL was defined as the addition of CK19 mRNA copies of each positive SLN.

Results of the first phase: When comparing OSNA technique with conventional histology, 100 metastatic SLN were detected in the conventional group study (47 macrometastases, 33 micrometastases), compared with 142 positive SLN (61 macrometastases and 47 micrometastases) in the OSNA group, with no

statistically significant difference ($p = 0.17$). Involvement of the SLN was detected in 80 patients (26.4%) by conventional histology and in 108 (35.3%) by OSNA assay ($p=0.11$). The ALND was performed on 185 patients after a positive SLN, in 108 patients (35.8%) in the OSNA group and in 77 patients (25.4 %) in the conventional histology group.

In all patients with positive SLN by OSNA assay the complementary ALND was performed in the same surgical procedure, whereas in the conventional study group, only in 50 patients (64.9%) the ALND was performed in the same surgery and in 27 patients (35.1%) was performed in a second surgical intervention ($p<0.001$). In the conventional histology group with an ALND performed in the same surgery, 42 patients (84 %) had macrometastases in the SLN and 8 patients (16%) had micrometastases. While in patients with ALND done in a second surgery due for intraoperative false negative result by conventional pathological study, 5 patients (18.5%) had macrometastases and 22 (81.5%) had micrometastases in the definitive pathology study.

Results of the second phase: The TTL is an independent predictor of non-SLN metastases in the complementary ALND, with an OR 1.67 (95%CI: 1.18 - 2.35). In the multivariate analysis, the TTL is a predictor of non-SLN metastases in patients with positive hormone receptor OR 1.69 (95%CI: 1.19 - 2.41), $p<0.003$. In our cohort of patients, with a TTL $1,2 \times 10^5$ copies/ml, a specificity of 85.3% and a negative predictive value of 80% was determined. Considering only patients with positive hormone receptor, with a TTL $\leq 5 \times 10^5$ copies/ml the specificity is 86.7% and a negative predictive value of 83.7%.

Conclusions: The OSNA assay can detect SLN metastasis more standardized than conventional intraoperative pathological technique, with no increasing in the detection of positive SLN and with no false negatives. It is a new method of evaluation of SLN in patients with breast cancer that reduces the need for a second surgery in 35.1% of patients with early stage disease who have a positive sentinel node. TTL assessed by OSNA assay predicts for additional non-SLN

metastasis and this intraoperative tool can help guiding decisions on performing a complementary ALND in breast cancer patients.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es el cáncer más frecuente en las mujeres. En Europa, se diagnostican alrededor de 429.900 nuevos casos de cáncer de mama cada año, con un riesgo estimado de desarrollar cáncer de mama en las mujeres europeas a lo largo de la vida de 1 de cada 9.^[1] Las tasas más bajas se encuentran en el este y sur de Europa (62,4 casos/100.000 h/año); y las más altas, en el norte y oeste de Europa (de 82,5 casos/100.000 h/año).

En España se diagnostican unos 22.000 nuevos casos de cáncer de mama al año, lo que representa casi el 30% de todos los tumores de la mujer en nuestro país, con una tasa de 50,9 casos/100.000 h/año. La mayoría de los casos se diagnostican entre los 35 y los 80 años, con un máximo entre los 45 y los 65 años. Existe una distribución geográfica de incidencia notablemente variable según las provincias. Así en Cataluña la tasa de incidencia es de 83,9 casos/100.000 h/año.^[2]

La supervivencia global por cáncer de mama en España es del 80,3% a los 5 años.^[3] Esta es superior a la media Europea, que se sitúa en el 76%, y próxima a la de países más desarrollados, como Francia, Suecia, Suiza, Italia, incluso EE.UU., que presenta una supervivencia a los 5 años del 81%.^[4]

La mortalidad por cáncer de mama en España, al igual que la incidencia, es de las más bajas de Europa: la tasa ajustada en 2007 fue de 26,3 muertes/100.000 h/año. En España mueren unas 6000 mujeres al año por cáncer de mama, lo que representa el 16,7% de todos los fallecimientos por cáncer en las mujeres, y el 3,3% del total de muertes entre las mujeres. La edad media al fallecimiento por cáncer de mama en España es de 66 años.^[2] La tasa de mortalidad varía según las diferentes comunidades autónomas, donde la menor se presenta en Melilla con una tasa ajustada de 11,6 muertes/100.000 h/año comparado con la mayor en el Principado de Asturias del 36,6 muertes/100.000 h/año en el año 2007. En Cataluña ese mismo año, la tasa de mortalidad por cáncer de mama fue del 26,6 muertes/100.000 h/año.^[5] No obstante, no disponemos de un sistema nacional de registro de tumores para conocer las cifras exactas.

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.^[3, 6, 7] El aumento de la incidencia se estima en un 1-2% anual y es constante desde 1960 en Estados Unidos. Sin embargo, la mortalidad por cáncer de mama ha disminuido ligeramente, debido en parte a la incorporación de la mamografía como técnica de screening y a la mejora de las terapias sistémicas.

1.2 Tratamiento local en el cáncer de mama

El tratamiento del cáncer de mama se ha dirigido de forma local a tratar la mama y los ganglios axilares y de forma sistémica a destruir las metástasis. A nivel mamario, la mayoría de las pacientes tienen la opción de elegir entre la cirugía conservadora asociada a radioterapia de la mama, ó la mastectomía. Estudios randomizados han demostrado que la cirugía conservadora ofrece la misma supervivencia que la mastectomía, uno de ellos con más de 25 años de seguimiento.^[8, 9] El segundo componente de la cirugía local es la cirugía de los ganglios axilares. El objetivo principal de la cirugía axilar es el control local, la estadificación del cáncer y de forma controvertida un pequeño beneficio en la supervivencia.^[10, 11] La linfadenectomía axilar ha sido considerada durante la mayoría del siglo XX como el tratamiento quirúrgico estándar para lograr estos objetivos.

1.2.1 La linfadenectomía axilar

El cirujano americano William Stewart Halsted fue el primero en describir la mastectomía radical (MR) en estudios publicados en 1894 y 1907.^[12, 13] Esta técnica incluía la resección quirúrgica de la glándula mamaria y el músculo pectoral incluyendo una linfadenectomía axilar completa, como procedimiento terapéutico del cáncer de mama, demostrando que el 31% de las pacientes (proporción significativa para la época) persistía libre de enfermedad a los 5 años

del tratamiento, coincidiendo con una reducción de la recurrencia locorregional (del 51% al 82% de recidivas en otras series al 6% en sus series). Estos resultados en el control local de la enfermedad y su impacto en la supervivencia hicieron que la mastectomía radical fuera el tratamiento quirúrgico estándar durante los 70 años siguientes. Este tipo de cirugía se basa en la teoría halstediana de diseminación del cáncer de mama en forma centrífuga, según la cual, el tumor empezaba localmente, infiltraba los conductos linfáticos hacia los ganglios regionales y de ahí generaba metástasis a distancia. Este concepto mecanicista de diseminación explicaba la táctica de esta cirugía radical. El objetivo de la linfadenectomía axilar en la era Halstediana (al igual que la mastectomía) era maximizar la tasa de curación minimizando la recidiva locorregional. Aunque estas técnicas surtieron efecto para el control local de la enfermedad, la realidad es que a pesar del tratamiento las pacientes morían por las metástasis.

Coincidiendo con la aceptación de cirugías menos radicales como la mastectomía radical modificada (MRM), la resección quirúrgica de la glándula mamaria y los ganglios axilares en bloque,^[14] en los años '70 Bernard Fisher propone que la supervivencia del cáncer de mama está relacionado con la biología del tumor y no con la extensión de la técnica quirúrgica.^[15] Fisher et al.,^[16] demostraron que los ganglios linfáticos no son una barrera para la diseminación de las células tumorales. Ellos indicaron la importancia biológica de los ganglios linfáticos y mostraron que hay razones biológicas más que anatómicas por lo que ciertos ganglios linfáticos en cáncer de mama contienen metástasis y otros no. Estos hallazgos les llevaron a concluir que no hay un patrón de progresión en la diseminación tumoral. Esta teoría está evaluada en el estudio NSABP (National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project) B-04 entre 1971 y 1974;^[10, 17] donde 582 pacientes con cáncer de mama y ganglios clínicamente afectados fueron randomizados a MRM versus mastectomía total asociada a radioterapia, y 1.079 pacientes con ganglios clínicamente negativos fueron randomizadas a MRM versus mastectomía total asociada a radioterapia versus mastectomía total. Este trabajo demostró, después de 25 años de seguimiento, que no habían diferencias estadísticamente significativas en la tasa de recurrencia local y locorregional

(figura 1), en la supervivencia total, supervivencia libre de enfermedad ni supervivencia libre de enfermedad a distancia entre las dos ramas de pacientes

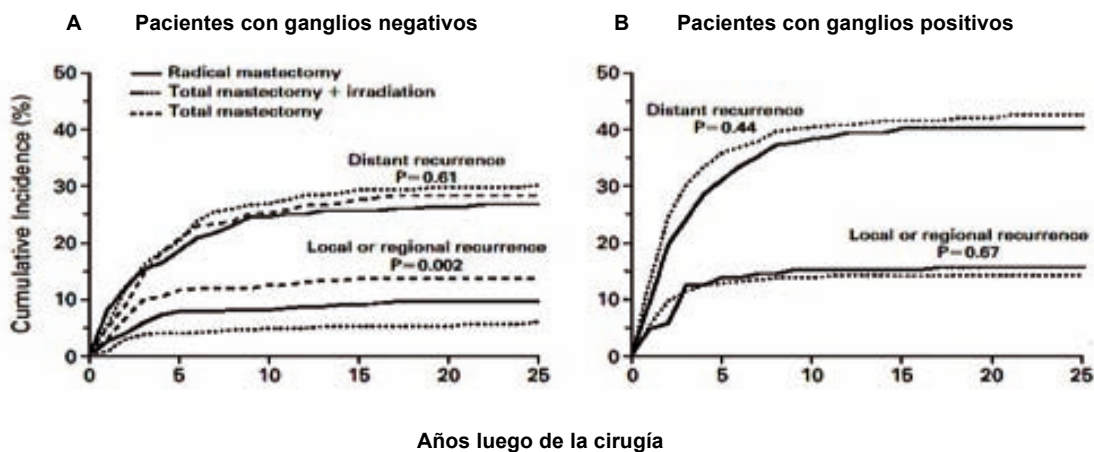


Figura 1: Incidencia acumulada de recidiva local o regional (Local or regional recurrence) y a distancia (Distant recurrence) durante los 25 años de seguimiento después de la cirugía en mujeres con ganglios axilares clínicamente negativos (Gráfico A) y mujeres con ganglios axilares clínicamente positivos (Gráfico B), según el grupo de tratamiento. En el gráfico A, los valores de p son para las tres curvas de comparación entre los grupos de tratamiento. Modificado de Fisher et al.^[8]

con ganglios clínicamente afectados y las tres ramas de pacientes con ganglios clínicamente negativos (figura 2).^[8]

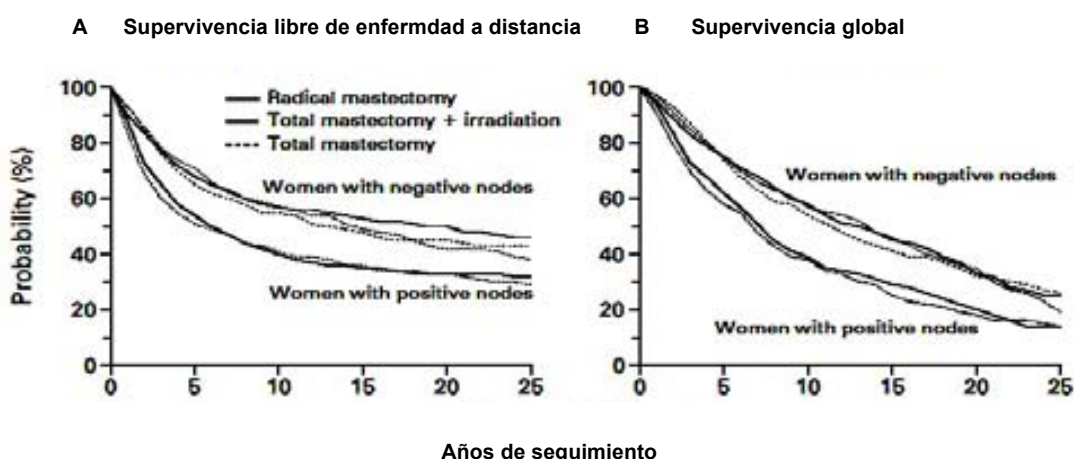


Figura 2: Supervivencia libre de enfermedad a distancia (Gráfico A) y la supervivencia total (Gráfico B) durante los 25 años de seguimiento después de la cirugía en mujeres con ganglios axilares clínicamente negativos ó positivos. No hubo diferencias significativas entre los grupos de mujeres con ganglios negativos o entre los grupos de mujeres con ganglios positivos en cualquiera de los dos análisis. Modificado de Fisher et al.^[8]

En este estudio, 68 pacientes (19%) con axila clínicamente negativa asignados aleatoriamente para no recibir tratamiento en la axila (cirugía o radioterapia)

desarrollaron una recidiva en los ganglios linfáticos axilares en la evolución, aproximadamente la mitad de la tasa esperada de la incidencia de ganglios positivos en la rama de MR; la resección de la recidiva axilar posterior en 68 pacientes (98%) demostró también la viabilidad del tratamiento quirúrgico de la recidiva axilar.

El estudio B-04 confirmó el significado pronóstico de las metástasis en los ganglios axilares, lo que llevó a incluir la linfadenectomía axilar en los estudios posteriores del NSABP sobre cáncer de mama. En la era Fisheriana del tratamiento del cáncer de mama, el objetivo primario de la LA fue la evaluación pronóstica para la selección de tratamiento adyuvante; y como objetivo secundario, el control local y su impacto en la supervivencia.

Posteriormente, una cohorte retrospectiva de la Columbia Británica realizada entre 1989 y 1990 que incluyó 8.038 pacientes tratadas por cáncer de mama cT1-2, evidenció un beneficio de supervivencia para la LA.^[18] En esta serie se comparó la omisión de la LA en el tratamiento quirúrgico en el 4, 8 y 22% de las pacientes entre 50 a 64, 65 a 74, y más de 74 años de edad, respectivamente. La falta de diferencias en la utilización de tratamiento sistémico, la recaída regional, y la supervivencia específica por cáncer de mama entre las pacientes de más de 74 años en las que se realizó LA en comparación con las que no fue realizada, sugiere que la LA podría ser omitida de forma selectiva en esta cohorte de edad avanzada. Sin embargo, la menor supervivencia asociada con la omisión de la LA en el grupo de 65-74 años, y la falta de ventaja en la supervivencia en las mujeres de 50-64 años a pesar del uso de tratamiento sistémico comparable entre ambos grupos, apoya la hipótesis que la terapia locorregional definitiva puede tener un impacto en la supervivencia.

Una relación similar entre disección axilar y la supervivencia se evidenció en el estudio retrospectivo de más de 250.000 pacientes diagnosticadas con cáncer de mama entre 1988 y 2000 de la base de datos del programa SEER (Surveillance, Epidemiology and End Results).^[19] La supervivencia fue significativamente mejor entre las mujeres en que se realizó LA, aún controlando por edad, tipo de cirugía,

el estado de los receptores hormonales, estadio y RT adyuvante; concluyendo que la mejora de la supervivencia en los casos con ganglios negativos en la LA puede ser debido a la eliminación de micrometástasis no detectadas.

Finalmente, el meta-análisis de Orr et al.,^[11] realizado con la literatura disponible hasta ese momento que incluye el B-04, demostró una pequeña pero estadísticamente significativa ventaja en la supervivencia del 5,4% para los pacientes con cáncer de mama con ganglios clínicamente negativos tratados con disección axilar. Este beneficio se observó en seis ensayos clínicos aleatorios, incluyendo una muestra de casi 3.000 pacientes en un poco menos de cuatro décadas de reclutamiento. A pesar de las diferencias en el diseño de los ensayos y sus poblaciones de pacientes, los seis ensayos mostraron resultados similares, con beneficios de supervivencia que varían entre el 4% al 16%. Este beneficio en la supervivencia no se limitó a los pocos pacientes con estadio II incluidos en los primeros ensayos. De hecho, el mayor beneficio se observó en el estudio Guy's II,^[20] que se limita a los pacientes con axila clínicamente negativa, cuyo autor concluye que la mayor ventaja de supervivencia fue evidenciada en aquellos pacientes que presentaban tumores de menos de 2 centímetros tratados con mastectomía radical en comparación con la escisión local exclusiva (Figura 3). Sin embargo este meta-análisis también incluye los resultados del Instituto Curie que mostraba un beneficio en la supervivencia a los 5 años que no se demostró en la actualización de los resultados a los 15 años.^[21]

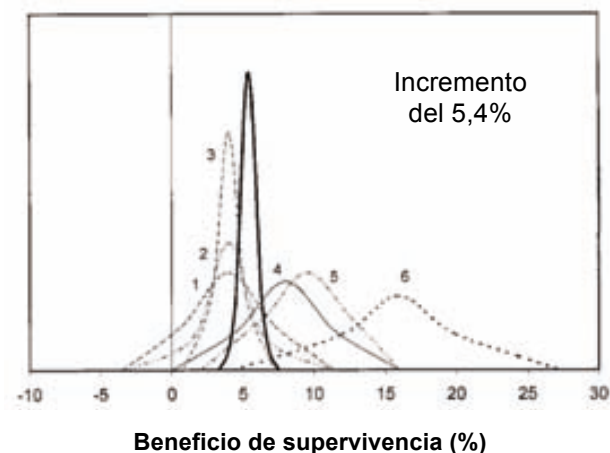


Figura 3: Análisis Bayesiano del beneficio de supervivencia. Modificado a partir del metaanálisis de Orr et al.^[11] La línea oscura representa el resultado del metaanálisis. Los números del 1 al 6 los diferentes estudios incluidos. 1.Copenhagen; 2.B-04; 3.Curie; 4.Guy's I; 5.Scotland; 6.Guy's 2.

El compromiso de los ganglios linfáticos axilares sigue siendo el factor pronóstico más importante de pacientes con cáncer de mama.^[22-24] En general, existe una relación directa entre el número de ganglios linfáticos afectados y los resultados clínicos. La figura 4 muestra la supervivencia libre de enfermedad de acuerdo con el número de ganglios linfáticos positivos.^[25] Es de destacar que la supervivencia libre de enfermedad a 5 años de pacientes con ganglios negativos es aproximadamente el 80%, es decir 20% de los pacientes en este grupo de bajo riesgo todavía sufren una recaída. Por otra parte, solo el 20% de pacientes con 10 o más ganglios axilares afectados permanecen libres de enfermedad a los 5 años.

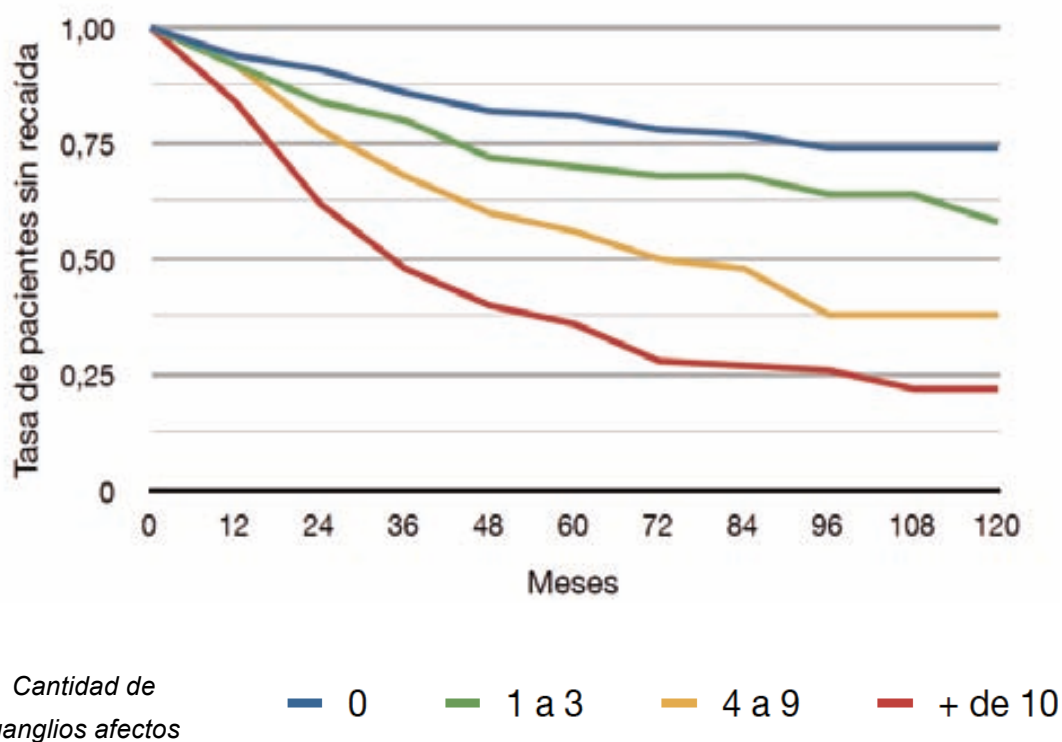


Figura 4: Supervivencia libre de enfermedad según cantidad de ganglios axilares afectados. Modificado de Edge et al.^[26]

1.2.2 Complicaciones de la linfadenectomía axilar

La linfadenectomía axilar no está exenta de efectos secundarios. Las complicaciones mayores son infrecuentes e incluyen la lesión vascular, la trombosis de la vena axilar, o las lesiones de los nervios motores de la axila. Sin

embargo, las menores son muy frecuentes y hasta un 80% de las pacientes sometidas a una LA presentan algún tipo de complicación.

LINFEDEMA:

El linfedema es la complicación que más interfiere en la calidad de vida de las pacientes. No hay estudios poblacionales grandes que estimen su incidencia, al igual que la evidencia en la literatura está sujeta a una amplia variación en su definición, sus métodos de diagnóstico y de evaluación, las características de los pacientes afectos, la extensión de la cirugía, la extensión del RT y la duración del seguimiento. Dependiendo del tratamiento axilar y del tiempo transcurrido del mismo aproximadamente, una de cada cuatro mujeres desarrollará edema del brazo después del tratamiento del cáncer de mama.^[27]

En una revisión sistemática de diez estudios realizados entre 1991 y 2000, la incidencia de linfedema fue del 26%, variando del 2 % (en pacientes sin tratamiento axilar) al 43 % (en pacientes con LA asociada a RT),^[28] y parece estar relacionada con la edad del paciente y el índice de masa corporal.^[28]

La prevalencia de linfedema aumenta con el tiempo y la duración del seguimiento. En una encuesta de 1.151 mujeres tratadas por cáncer de mama, Mortimer et al.^[29] evidenció que la prevalencia de edema del brazo aumenta con el tiempo después de la radioterapia (23% a los 0-2 años después del tratamiento, al 45% a los 15 años o más). Un aumento menor en la prevalencia del linfedema a largo del tiempo era evidente para el grupo tratado sólo con LA, en el que la prevalencia aumentó del 20% a los 0-2 años, al 30% a los 15 años o más después del tratamiento. La morbilidad asociada al linfedema va desde hinchazón, limitación en la amplitud del movimiento del brazo, dolor y debilidad (asociado al peso que conlleva), ó rigidez en la extremidad afectada, interfiriendo en la vida diaria en el 33% de los pacientes.^[28]

SINDROME DE LA CUERDA AXILAR (AXILLARY WEB SYNDROME, AWS):

Descrito por Moskovitz,^[30] el AWS se caracteriza por la aparición de una cuerda axilar representada por un cordón fibroso subcutáneo a tensión que se extiende

desde la base de la axila hacia la cara interna del brazo asociado a dolor y limitación del movimiento, en el 6% de los pacientes, entre 1 a 8 semanas después de una linfadenectomía axilar. La interrupción quirúrgica de vasos linfáticos y de venas próximas a la axila parecen ser factores importantes en la etiopatogenia del proceso, teoría apoyada por la evidencia anatomopatológica de trombosis a nivel de venas, vasos linfáticos subcutáneos, o ambos, en las biopsias de pacientes con AWS. Se trata de un proceso benigno, de resolución espontánea, que no requiere tratamiento específico.

MORBILIDAD SENSITIVA:

Las secuelas sensitivas de la LA están en gran medida relacionadas con la sección quirúrgica de los nervios sensitivos, principalmente el nervio intercostobraquial. Sin embargo las modificaciones de la técnica quirúrgica de la LA que permiten la preservación del nervio intercostobraquial no ha demostrado cambios sustanciales. Freeman et al.^[31] en un estudio randomizado que comparó la preservación del nervio intercostobraquial con su sección quirúrgica demostró que solo un síntoma difería entre ambos grupos, la sensación subjetiva de “sensación diferente” ($p=0,006$). No se observó ninguna diferencia significativa en otros síntomas sensitivos, dolor, movimiento del hombro, la circunferencia del brazo ó la presencia de neuomas; sin embargo el área medida de déficit sensitivo fue mayor en las pacientes en las cuales se seccionó el nervio en comparación en las que fue conservado ($p=0,009$).

INFECCIÓN:

La celulitis del brazo, de la pared torácica o de la mama es un efecto secundario bien documentado pero relativamente poco frecuente de la LA, que presumiblemente refleja una alteración de la inmunidad local producida por la cirugía. La incidencia de la celulitis es desconocida. El estudio de Roses et al.,^[32] de las 200 pacientes seguidas uno o más años después de la LA por cáncer de mama, el 5,5% desarrolló celulitis y el 2% varios episodios. La celulitis puede aparecer después de una lesión cutánea no estéril (corte, abrasión ó quemadura), pero a menudo aparece sin una lesión de continuidad obvia. En ocasiones, los episodios repetitivos de celulitis aumentan el riesgo de linfedema, aunque no

queda claro en este contexto, si la infección es una causa del linfedema o una consecuencia propia del mismo.

MORBILIDAD MOTORA:

El riesgo de lesión nerviosa motora durante una LA es menor al 1%. En general pueden ser temporales o definitivas, causadas por compresión o lesión quirúrgica del nervio afectado. Su gravedad dependerá de la función que desempeñe el nervio dañado. La parálisis del serrato como consecuencia de la lesión del nervio torácico largo o nervio respiratorio de Bell causa la "escápula alada", pudiendo llevar a síntomas como dolor, debilidad ó limitación de la movilidad del hombro, sobre todo al levantarlo a más de 90 grados, condición que puede ser incapacitante en la vida diaria de los pacientes.^[33] La lesión del nervio toracodorsal debilita la abducción y la rotación interna del brazo y la lesión del nervio pectoral lateral y medial produce limitación de la movilidad del hombro con impacto cosmético por la atrofia secundaria.

1.2.3 Biopsia selectiva del ganglio centinela

En las últimas décadas, la biopsia selectiva del ganglio centinela (BSGC) ha reemplazado a la linfadenectomía axilar. Esta técnica fue descrita por primera vez por Krag et al.^[34] en 1993 y Giuliano et al.^[35] en 1994. La introducción de la BSGC se ha convertido en una alternativa validada para la estadificación ganglionar axilar, con una menor morbilidad para la población creciente de pacientes con ganglios clínicamente negativos. Aunque inicialmente algunos estudios sugerían una mejoría de la supervivencia de las pacientes sometidas a una linfadenectomía axilar en comparación con las pacientes en las que no se realizaba ninguna cirugía axilar, la probabilidad de que la eliminación de ganglios linfáticos negativos pueda mejorar los resultados ha sido cuestionada.^[8] En la actualidad, en pacientes con cáncer de mama y ganglios linfáticos clínicamente negativos, el mapeo linfático intraoperatorio y la BSGC son procedimientos mínimamente invasivos aceptados como alternativa a la linfadenectomía axilar para la estadificación de los ganglios linfáticos axilares.^[36]

El primer estudio piloto que investigó el uso de radioisótopos (tecnecio99) para la identificación del GC en cáncer de mama fue realizado por Krag et al.^[34] quienes demostraron una precisión del 100% en la detección del GC. Este mismo grupo llevó a cabo la validación de la técnica en un estudio multicéntrico con 443 pacientes y demostró que la BSGC podía predecir la presencia o ausencia de ganglios axilares metastásicos en pacientes con cáncer de mama y que el éxito de la técnica dependía de los cirujanos y de las características de la pacientes.^[37]

Giuliano et al.,^[35] fueron los primeros en estudiar la viabilidad de identificación intraoperatoria del GC en cáncer de mama utilizando un colorante azul. En 1991, el grupo comenzó a investigar la factibilidad de mapeo linfático mediante la inyección de un colorante vital, el azul de isosulfan, y la identificación y linfadenectomía del ganglio centinela con un enfoque de estadificación más preciso y con menor morbilidad en pacientes con cáncer de mama en estadios precoces. Este estudio piloto demostró que la BSGC era técnicamente factible, segura y sin complicaciones añadidas; y que con una técnica adecuada y experiencia se lograba hasta un 100% de precisión para predecir el estado de la axila.^[35, 38] Estos autores demostraron que la probabilidad de detectar un ganglio axilar afecto era significativamente mayor con la técnica del GC (61,9%) que mediante muestreo aleatorio de ganglios axilares (17,5%) ($p < 0,0001$).^[35]

En un estudio posterior establecieron la hipótesis de que no sólo la BSGC era válida para la clasificación del cáncer de mama, sino que además podía facilitar la estadificación de la axila permitiendo al patólogo analizar uno o dos ganglios que tenían más posibilidades de tener metástasis, en vez de estudiar al azar todos los ganglios de la LA.^[39]

En 1996, Albertini et al.^[40] utilizaron la combinación de colorante azul y radioisótopos para localizar el GC con una tasa de identificación del 92% y con una precisión del 100%. Finalmente Veronesi et al.^[41] propusieron el uso de la linfocentigrafía preoperatoria junto con radiolocalización intraoperatoria para aumentar la precisión e identificar el drenaje extra axilar antes de la cirugía. Estos autores demostraron que el GC se identificó en el 98% de los casos y predijo el

estado de la axila en el 97,5%. Concluyeron que la BSGC en cáncer de mama era una técnica factible, segura y predictiva del estado ganglionar axilar. Todos estos primeros estudios demostraron que el estado del GC reflejaba en más del 95% el estado de los ganglios axilares. Se precisaban nuevos estudios randomizados que compararan los resultados oncológicos de la BSGC y la LA en pacientes con ganglio centinela negativo

1.2.4 Rol del GC en la estadificación axilar

Varios estudios han demostrado la viabilidad de la BSGC como un procedimiento estándar de estadificación axilar de pacientes con cáncer de mama con axila clínicamente negativa reportando su tasa de identificación, que varía del 86% al 97%, con una precisión del 96% al 98% y una tasa de falsos negativos entre el 4% y el 16,7%.^[42-49] El meta-análisis de Kim et al.,^[50] demostró que el estado de los GC pueden predecir con exactitud el estado axilar con una tasa de falsos negativos promedio de 7,3%. La técnica del GC fue rápidamente aceptada por las comunidades quirúrgicas y oncológicas incluso antes que la evidencia definitiva de los ensayos controlados aleatorios estuviera disponible para demostrar su seguridad a largo plazo. Esto ocurrió debido a que la BSGC ha demostrado ser una prueba diagnóstica precisa para evaluar el estado de los ganglios linfáticos axilares, lo que ha llevado a que sea incorporada en el sistema de estadificación del cáncer de mama de la American Joint Committee on Cancer (AJCC) en su actualización de 2002.^[51]

En este sentido, el estudio de Veronesi et al.^[52] fue el primer ensayo aleatorio que reportó sus resultados después de 10 años de seguimiento de pacientes con BSGC con o sin LA complementaria. Se trata de un estudio de un solo centro que incluyó más de 500 pacientes con tumores de mama < 2 cm de tamaño, randomizadas a BSGC seguido de LA, ó a BSGC sólo, y con disección axilar sólo si el GC fuera positivo. Los resultados iniciales de este estudio fueron publicados en 2003, donde la tasa de falsos negativos del GC fue del 8,8%, con una precisión global del 96,9%.^[53] En la actualización del seguimiento a los 79

meses,^[54] posteriormente confirmada en la de los 102 meses^[52] no hubo diferencias entre los grupos con respecto a la supervivencia libre de enfermedad (89,9% en el grupo GC solo vs. 88,8% en el grupo LA), con una supervivencia global ligeramente mayor en el brazo de GC en comparación con el brazo de LA (del 93,5% vs. 89,7%, respectivamente) sin evidenciar diferencias estadísticamente significativas ($p=0,15$). Se evidenciaron un total de 49 eventos relacionados con el cáncer de mama, 23 en el brazo GC y 26 en el brazo de la LA ($p=0,52$). Es de destacar que en este estudio hubo sólo dos recidivas axilares (0,39%), ambas se produjeron en el grupo con GC exclusivo (0,77%), diferencia no estadísticamente significativa comparada con la LA ($p=0,17$).

Por otro lado, el estudio de la National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) B-32 fue diseñado para determinar si la resección del GC logra los mismos resultados terapéuticos que la linfadenectomía axilar, pero con menos efectos secundarios.^[55, 56] El objetivo primario del estudio fue evaluar la supervivencia, el control regional, y la morbilidad. Más de 5.500 pacientes fueron asignadas al azar a los grupos de tratamiento: la resección del GC más LA; ó la resección del GC exclusiva, asociada a LA sólo si los GC fueran positivos. Los resultados actualizados de la cohorte de pacientes con GC negativo evidenciaron que la supervivencia global en ambos grupos no demostró diferencias estadísticamente significativas con un hazard ratio (HR) de 1,20 (0,96-1,50; IC del 95%, $p=0,12$). Las estimaciones de supervivencia global a los 8 años fueron del 91,8% en el grupo con GC exclusivo y del 90,3% en el grupo de GC más LA. La supervivencia libre de enfermedad evidenció un HR de 1,05 (0,90-1,22; IC del 95%, $p=0,54$), a los 8 años de 82,4% en el grupo con GC exclusivo y del 81,5% en el grupo de GC más LA.^[56] Hubo ocho recurrencias en los ganglios regionales en el grupo con GC exclusivo y 14 en el grupo con GC más LA ($p=0,22$). Los eventos adversos más comunes fueron reacciones alérgicas, sobre todo relacionados con la administración del colorante azul. La interpretación de los resultados llevó a los autores a concluir que, en pacientes con GC negativos, la supervivencia global, la supervivencia libre de enfermedad y el control regional fueron estadísticamente equivalentes entre la BSGC seguida de LA y BSGC sola,

siendo la BSGC una técnica adecuada, segura y efectiva para pacientes con cáncer de mama y axila clínicamente negativa.

1.2.5 Reducción de la morbilidad axilar

Varios ensayos clínicos, randomizados y controlados, han demostrado de manera concluyente que la BSCG se asocia con una menor morbilidad del brazo y el hombro y con una mejor calidad de vida de los pacientes cuando se compara con la linfadenectomía axilar.^[54, 57] Tanto la LA como la BSCG o la irradiación de la axila presentan complicaciones y secuelas a nivel axilar, pero los estudios demuestran que éstas son menores en los pacientes sometidos a BSGC en comparación con la LA. En la BSGC la incisión cutánea es más pequeña con menor disección del tejido axilar lo que se refleja en menos morbilidad que la LA completa demostrado en diferentes estudios randomizados.^[42, 53, 54, 58, 59] Con la BSGC hay menos dolor, menor limitación de la movilidad del hombro, y menos secuelas neurológicas;^[54] menor frecuencia de parestesias, infecciones y seromas;^[59] se evita utilizar drenajes lo que genera menor malestar al paciente y menor estancia hospitalaria con un retorno más rápido a las actividades normales lo que mejora la calidad de vida.^[42] Y como más importante la reducción en la incidencia de linfedema, que oscila entre el 0% y el 13% en la BSGC en comparación con el 7% y el 77% de la LA.^[60]

Otros tres estudios también randomizados, demostraron menor morbilidad sensorial en pacientes con BSGC en comparación con la LA.^[42, 53, 61] En el estudio ALMANAC, la incidencia reportada de déficit sensorial a los 12 meses de la cirugía fue menor en el grupo tratado mediante GC en comparación con la LA (11% vs. 31%), con un riesgo relativo de déficit sensorial de 0,37 (IC 95%; 0,27-0,50).^[42] La morbilidad sensorial disminuye significativamente a medida que progresa el tiempo, sobre todo en los primeros tres meses después de la cirugía y no requiere un tratamiento específico.

1.3 Estudio anatomopatológico del GC

El ganglio centinela es el primer ganglio que contiene metástasis en el cáncer de mama. El número limitado de ganglios que se obtienen en una biopsia de GC en comparación con una LA ha llevado a un análisis más exhaustivo de los GCs y a un aumento en la detección de micrometástasis.

Cuando el grupo de Giuliano et al.^[39] comparó la frecuencia de metástasis axilares en pacientes con LA vs GC seguido de LA complementaria, evidenció que el 29,1% de los pacientes del grupo LA sola presentaban metástasis axilares comparado con el 42% del grupo GC seguido de LA ($p=0,03$). El hecho de tener que analizar uno o dos GC frente a la media de 15 ganglios en la LA ha hecho que el examen patológico de los GC sea más exhaustivo. La evaluación mediante la técnica de hematoxilina-eosina (H&E) realizada en secciones múltiples del GC aumenta la sensibilidad para detectar micrometástasis frente a las detectadas en la LA directa (9,2% vs 3%, respectivamente, $p=0,004$), y cuando se agregan técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) al estudio por H&E, el aumento de la sensibilidad es aún mayor (16% vs 3%, $p=0,0005$).

El objetivo del estudio anatomopatológico de los ganglios centinela en pacientes con cáncer de mama no está tan encaminado a encontrar todas las metástasis, sino detectar las metástasis clínicamente relevantes, es decir aquellas metástasis que están asociadas con más ganglios metastásicos en la linfadenectomía axilar (que hace necesario continuar con el tratamiento locorregional) o que indican un pronóstico adverso (que requiere terapia sistémica adyuvante).^[62]

El estudio anatomopatológico de los ganglios centinela puede realizarse durante la cirugía de resección del tumor primario en el estudio intraoperatorio lo que permite completar la LA en la misma intervención. O puede realizarse de forma diferida después de la cirugía, en este caso, si estuviera indicada la LA complementaria se realizaría en una segunda intervención.

1.3.1 Estudio intraoperatorio del GC

El estudio intraoperatorio del GC se puede realizar por diferentes métodos. Además del examen macroscópico cuidadoso, es necesario verificar los hallazgos macroscópicos con un estudio microscópico. El estudio intraoperatorio anatomopatológico del GC se puede realizar por dos métodos: el corte por congelación y la impronta citológica.

Corte por congelación:

El análisis de corte por congelación generalmente se realiza mediante la congelación de una sola sección del GC teñida con H&E (figura 5). Es bien conocido que a partir del estudio postoperatorio mediante secciones múltiples del GC asociado a técnicas de IHQ, hasta el 15-20% de las metástasis del GC puede pasar desapercibidas en el estudio intraoperatorio, por lo que la sensibilidad teórica para la detección de metástasis mediante esta técnica no es superior al 80-85%. En la práctica, la sensibilidad será aún menor en condiciones no apropiadas relacionadas con la técnica de sección por congelación.

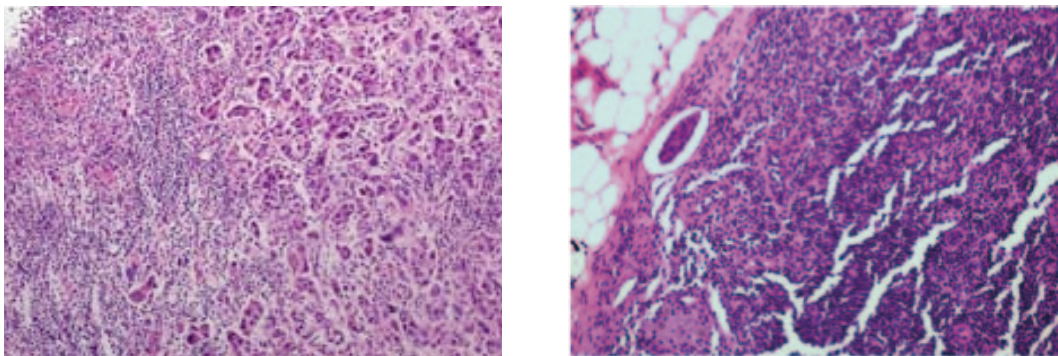


Figura 5: Técnicas de estudio anatomopatológico intraoperatorio del ganglio centinela mediante cortes por congelación. A: corte por congelación. B: metástasis subcapsular en el estudio en parafina.

El primer estudio que evaluó la utilidad intraoperatoria de los cortes por congelación para la valoración del GC en 54 pacientes con cáncer de mama, detectó 27 de 31 metástasis del GC mediante este procedimiento.^[63] Estos autores describieron una sensibilidad del 87%, con una especificidad del 100%, un valor predictivo positivo del 100% y un valor predictivo negativo del 91%. Sin

embargo, estos buenos resultados iniciales han elevado las expectativas demasiado altas con respecto a la sensibilidad de esta técnica. En un estudio posterior más grande, la sensibilidad se redujo alrededor del 60% cuando se agregaban pacientes con carcinomas lobulillares, ó cuando el estudio era realizado por los patólogos menos experimentados.^[64-67] En general, la capacidad del estudio intraoperatorio por congelación del GC es claramente superior para detectar metástasis en el caso de macrometástasis que el de micrometástasis.^[66, 68, 69]

Durante el procesamiento intraoperatorio por congelación del GC se debe tener especial precaución en la técnica de congelado y el corte de la muestra para evitar la pérdida inadvertida del tejido. Las secciones múltiples intraoperatorias son las que más pérdida de tejido generan. Sin embargo, es inevitable que algo de material del GC se pierda, y esto puede conducir a la falta de detección de algunas pequeñas metástasis. Naturalmente, la posibilidad de que esto ocurra dependerá de la extensión del procedimiento de sección por congelación, y del tamaño y la distribución de las micrometástasis.^[70] El porcentaje de metástasis del GC descartadas durante el procesamiento del tejido es probablemente bajo si se toman las medidas adecuadas para prevenir la pérdida excesiva de tejido. Por otra parte hay que tener en cuenta que en el estudio intraoperatorio sólo se examina, mediante esta técnica, alrededor del 1% del total del volumen del GC.^[71]

Sólo un protocolo para la evaluación de los GC para detectar todas las metástasis de más de 2 mm puede respaldarse en base a la evidencia. Se trata de la sección fina de los ganglios a intervalos de 2 mm, la fijación de todas las secciones, y el examen de una superficie de sección de cada bloque.^[72] El objetivo principal es asegurar que todas las macrometástasis mayores de 2 mm se identificaran microscópicamente siempre que las secciones del GC no sean más gruesas que 2 mm antes de la inclusión en parafina. Cuando los ganglios se cortan en serie, se debe tener especial cuidado de colocar las secciones en la caseta de fijación de tal manera de evitar tejido no examinado de más de 2 mm; es en este paso donde el estudio también depende de los técnicos en histología que procesan las muestras. La incorrecta colocación de las superficies de sección para la

evaluación microscópica aumenta la tasa de falsos negativos de la técnica (figura 6).

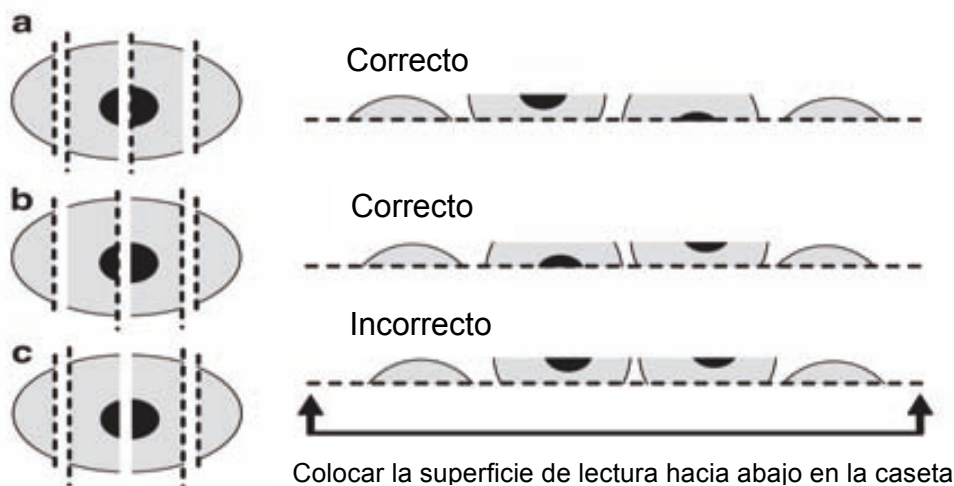


Figura 6: Preparación de un ganglio centinela después de su corte y fijación en parafina para la evaluación microscópica de secciones múltiples. Las líneas discontinuas representan la superficie colocada hacia abajo en la bandeja. (a) y (b) representan secciones ganglionares colocadas en la caseta de manera que las superficies opuestas se examinan al microscopio, donde solo una de las lesiones seccionadas quedará en la superficie opuesta. (c) muestra la colocación incorrecta de las secciones centrales en la caseta donde ninguna de las secciones centrales se evaluó microscópicamente llevando a un diagnóstico erróneo. Modificado de Weaver et al.^[72]

Impronta citológica:

La impronta citológica consiste en el estudio del GC mediante su hemisección o secciones múltiples de 2 a 3 mm de espesor según el tamaño del ganglio y la impronta de todas las caras en un portaobjetos, con fijación en alcohol 96° y coloración con azul de toluidina (figura 7). Con menos frecuencia se utiliza el estudio citológico del material obtenido a partir del raspado de la superficie de la hemisección ganglionar. La impronta citológica presenta una sensibilidad para la detección de metástasis del GC del 62%, significativamente inferior al estudio por cortes por congelación, con una especificidad del 100%.^[63]

Sin embargo, otros autores presentan mejores resultados. VanderVeen et al.^[73] publicaron un estudio ciego prospectivo comparando la impronta citológica con el corte por congelación en el que concluyen que ambas técnicas tienen una precisión similar y pueden utilizarse de forma segura para identificar la mayoría de

los pacientes con metástasis de GC. Por otro lado, Motomura et al.^[74] describieron una sensibilidad de la impronta citológica intraoperatoria del 91% y que la misma era más precisa que el análisis de cortes por congelación y H&E. Turner et al.^[75] y Upender et al.^[76] demostraron una alta sensibilidad de detección utilizando una combinación de sección por congelación e impronta citológica, al igual que el aumento de la superficie de muestreo mediante impronta citológica de secciones múltiples mejoraba la proporción de ganglios centinela afectados detectados durante el estudio intraoperatorio.^[77] Por consiguiente, la impronta citológica parece ser razonablemente útil para la evaluación intraoperatoria del GC con un rendimiento comparable al corte por congelación; sin embargo su uso es menos común, la mayoría de las instituciones prefiere utilizar la sección por congelación.^[78, 79]

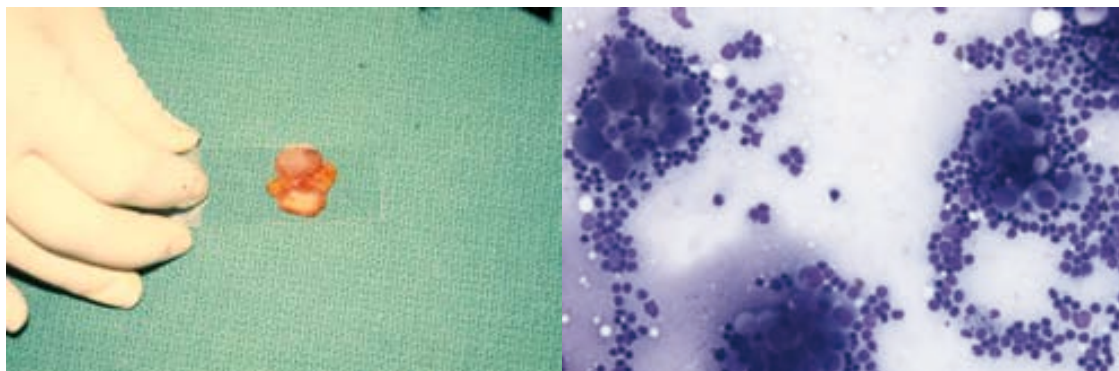


Figura 7: Técnicas de estudio anatomopatológico intraoperatorio del ganglio centinela mediante impronta citológica.

Los resultados falsos negativos, tanto de la impronta citológica como del estudio por cortes por congelación, en general se producen en pacientes con micrometástasis, tumores bien diferenciados y en el carcinoma lobulillar infiltrante.^[80-82]

La utilización de cada técnica depende de la infraestructura de los Servicios de Anatomía Patológica y de la experiencia de los patólogos en citología.

1.3.2 Estudio anatomopatológico definitivo del GC

La importancia del método de evaluación del GC radica en determinar la carga tumoral del GC metastásico así como si esta metástasis influye en el resto de los ganglios de la axila. El estudio definitivo del GC consiste en fijarlo en formaldehído e incluirlo en parafina. Posteriormente se procede a su sección, de acuerdo a su tamaño, para posteriormente realizar la tinción de rutina mediante la técnica de H&E. Hay varios protocolos propuestos para la sección. El utilizado generalmente varía la cantidad de secciones según el tamaño del GC. Los GCs más pequeños de 0,5 cm se procesan en parafina intactos; aquellos entre 0,5 y 1 cm se seccionan a la mitad; y aquellos de más de 1 cm se seccionan en piezas de aproximadamente 0,2-0,5 cm de tamaño.

La 7ª edición del American Joint Committee on Cancer's (AJCC) Staging Manual distingue las metástasis en los ganglios axilares en micrometastasis y macrometastasis de acuerdo a su tamaño (0,2-2 mm y > 2 mm, respectivamente), y clasifica las metástasis < 0,2 mm como células tumorales aisladas considerándolas como pN0.^[26]

Evidentemente, el estudio del GC mediante secciones múltiples sólo es necesario cuando la evaluación intraoperatoria del mismo y la primera sección en el estudio diferido complementario revelan que no hay compromiso metastásico.

Inmunohistoquímica:

La IHQ es una técnica que en principio demostró ser útil para la detección de metástasis de pequeño tamaño en los GCs, especialmente micrometástasis y células tumorales aisladas. En general, la IHQ aumenta el porcentaje de metástasis encontradas en los ganglios linfáticos axilares en comparación con la era pre-centinela en un 20%,^[36, 83] siendo mayor en el cáncer de mama lobulillar. Por otro lado, el aumento de detección de GCs positivos mediante el ultrastaging (con diferentes protocolos de anatomía patológica) es del 11% (rango entre 2 y 20%).^[84]

De cualquier forma, el estudio por IHQ, bien intraoperatorio o definitivo, no está recomendado por la Sociedad Americana de Oncólogos Clínicos ni por el Colegio Americano de Patólogos,^[72] y esta recomendación se ha hecho más evidente después de los resultados del estudio Z0010, que ha demostrado que las metástasis detectadas por IHQ parecen no tener impacto en la supervivencia global.^[85]

Técnicas de inmunohistoquímica intraoperatoria en secciones por congelación:

El Instituto Europeo de Oncología de Milán describió esta técnica que combina secciones múltiples por congelación asociadas a IHQ rápida para el diagnóstico intraoperatorio definitivo de los GC en cáncer de mama, permitiendo predecir correctamente los GC libres de metástasis en el 95,4% de los casos.^[86, 87]

Se trata de un procedimiento muy laborioso que aumenta en forma significativa el tiempo del estudio intraoperatorio hasta en una hora. Sin embargo, se ha descrito una modificación de la técnica, con una metodología similar pero más rápida, de unos 40 minutos, en la que se estudia en forma completa el GC con pares de secciones cada 50 micras para las primeras 15 secciones y cada 100 micras a partir de entonces, permitiendo predecir correctamente la ausencia de compromiso axilar en el 95,3% de los pacientes^[88] y requiriendo la utilización de técnicas de IHQ ultra rápidas.^[89]

Krishnamurthy et al.^[90] publicaron un estudio prospectivo comparando varios métodos para el estudio intraoperatorio del GC, llegando a la conclusión que la combinación de la sección por congelación con técnicas de IHQ rápida fue superior a la impronta citológica, con resultados comparables a los del examen patológico definitivo.

1.4 Discrepancias en el estudio intraoperatorio del GC

El examen histopatológico convencional de los ganglios centinela no está estandarizado.^[78] Aunque hay acuerdo general que el ganglio centinela debe ser seccionado a intervalos de 1,5 a 2 μm para la evaluación patológica, no existe consenso con respecto al método óptimo para el examen intraoperatorio.

Una encuesta realizada por el European Working Group for Breast Screening Pathology (EWGBSP) en 240 servicios europeos de anatomía patología evidenció 123 protocolos diferentes en la práctica actual de la evaluación patológica de los ganglios linfáticos centinela en cáncer de mama.^[78]

La mayoría de los laboratorios, 193 de 240 (80%), tenían sus propias pautas para tratar el GC. En 119 se conocía el protocolo nacional del estudio del GC pero sólo 105 lo utilizaban. En cuanto a la metodología de estudio, sólo el 88% realizaba muestreo en secciones múltiples, la variación entre las distancia de los cortes era entre 2 y 500 μm , el 25% realizaba muestreo completo y el 71% utilizaba técnicas de IHQ. El método más común utilizado era la sección a 6 niveles del GC separados por 150 μm , y sólo el 61% de los encuestados realizaba estudio intraoperatorio. Sólo el 82% de las definiciones de micrometástasis utilizadas estaban de acuerdo con la definición actual ó anterior del TNM, y el 18% de los encuestados utilizan definiciones heterogéneas como depósitos subcapsulares ó agregados celulares pequeños. Por tanto, la variabilidad en el estudio patológico del GC es notoria.

Incluso con todo lo anterior, la especificidad de estas técnicas es excelente pero la sensibilidad es muy variable y oscila entre un 50% a 75%. Las técnicas de IHQ permitirían una evaluación más detallada que en teoría podría mejorar la capacidad de detectar metástasis, en particular micrometástasis, en los ganglios estudiados.^[91] Hay trabajos que demuestran que el estudio intraoperatorio del GC mediante secciones en congelación a intervalos de 50 μm aumenta considerablemente la sensibilidad de la detección de la enfermedad metastásica, aunque no es factible ni práctico en la mayoría de centros.^[90]

Por otro lado, la evaluación patológica intraoperatoria examina una cantidad muy pequeña del tejido linfoide y esto está sujeto a una variabilidad de interpretación interobservador,^[92] lo que ha impulsando el desarrollo de técnicas más estandarizadas.

1.5 La técnica OSNA

Recientemente, se ha incorporado una técnica estandarizada que permite la evaluación intraoperatoria del GC en forma completa, evitando así errores de muestreo.

La técnica OSNA (One Step Nucleic Acid Amplification) que se traduce también como “amplificación de ácido nucleico de un solo paso” (Sysmex Corporation, Kobe, Japan) es un procedimiento molecular, automático (mediante un aparato llamado RD-100i; figura 8A), que realiza una determinación cuantitativa de la expresión del ARNm, utilizando el método de amplificación isotérmico RT-LAMP (“Reverse Transcription-Loop mediated Isothermal Amplification”). Es un método sencillo, rápido y específico para la amplificación de ácidos nucleicos.

En el marco del desarrollo de la técnica OSNA para su utilización en cáncer de mama han sido analizados muchos marcadores de ARNm como posibles candidatos específicos para la detección de metástasis de cáncer de mama en los

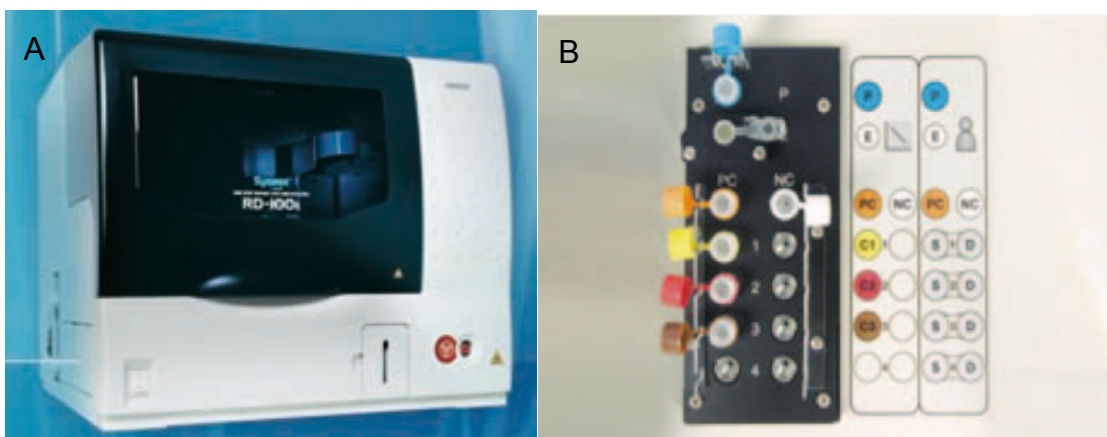


Figura 8: Técnica OSNA. A: aparato de determinación RD-100i. B: sitio de colocación de muestras del RD-100i.

ganglios linfáticos. Se seleccionaron 7 marcadores para una evaluación posterior en la que se utilizaron un gran número de ganglios linfáticos individuales. Finalmente, el ARNm de citoqueratina 19 (CK19) demostró ser el mejor marcador, ya que presentaba la mejor sensibilidad, y debido a su alta tasa de expresión en ganglios linfáticos metastásicos y a la baja tasa de expresión en ganglios linfáticos no metastatizados, proporcionaba la mejor discriminación entre ellos.

La calidad de un estudio molecular depende en gran medida del diseño óptimo del “primer”. El primer sirve como molécula iniciadora específica para la amplificación de una diana determinada. En los procedimientos moleculares convencionales, por lo general se aplican solamente 2 primers, mientras que el OSNA utiliza 6 primers diferentes. Éstos han sido diseñados especialmente para impedir la amplificación de los pseudogenes de CK19 o de sus productos de transcripción, que podrían conducir a resultados falsos positivos.

Estos 6 primers diferentes, reconocen determinadas regiones de la secuencia de la diana y se unen a ellas. LAMP utiliza una ADN-polimerasa con actividad de desplazamiento en cadena que funciona a una temperatura constante de aproximadamente 65°C, lo que impide la amplificación simultánea del DNA genómico. El sistema de detección se ejecuta con controles adecuados β -actina ARNm para comprobar la calidad del ARNm y un control positivo con un número de copias de ARNm de CK19 previamente determinado y un control negativo sin ARNm de CK19 para permitir la calibración de la máquina y comprobar la presencia de reactivos suficientes y ausencia de material contaminante.

La técnica OSNA fue validada para el estudio intraoperatorio de los ganglios centinela de las pacientes con cáncer de mama. Evalúa los ganglios linfáticos de forma completa obteniendo un resultado semicuantitativo de ARNm de CK19 expresado en el número de copias por μ L para la detección de metástasis ganglionares clínicamente relevantes.

Los resultados se obtienen de forma automática siendo: (-) para copias de CK19 de ARNm inferiores a 250/ μ L, lo que representa un resultado negativo; (+) para el

número de copias entre 250 y 5000/μL, representando la presencia de una micrometástasis; y (++) para el número de copias superior a 5000/μL, lo que representa una macrometástasis.^[93]

La amplificación no deseada del ADN genómico se evita debido a la precipitación del ADN a pH bajo (3,5) durante la preparación de las muestras y a la temperatura de reacción isotérmica de 65 °C.

El procedimiento de la técnica OSNA es simple. Los ganglios linfáticos individualmente se homogenizan en un reactivo especial, obteniendo una fase líquida que se introduce en la RD-100i que realiza el pipeteo, la amplificación y la detección de manera totalmente automática. Todos estos pasos deben ser realizados de forma estéril para evitar contaminación con ARN. El tiempo total necesario desde el inicio de la preparación del ganglio linfático hasta la obtención de los resultados es de aproximadamente 30 minutos para un ganglio linfático y de aproximadamente 40 minutos para 4 ganglios linfáticos (Figura 8B), con monitorización en tiempo real de la evolución de la determinación (Figura 9 y 10). Los ganglios no deben ser mayores de 0,6 gr, aquellos de mayor tamaño deben ser seccionados y procesados en muestras múltiples.

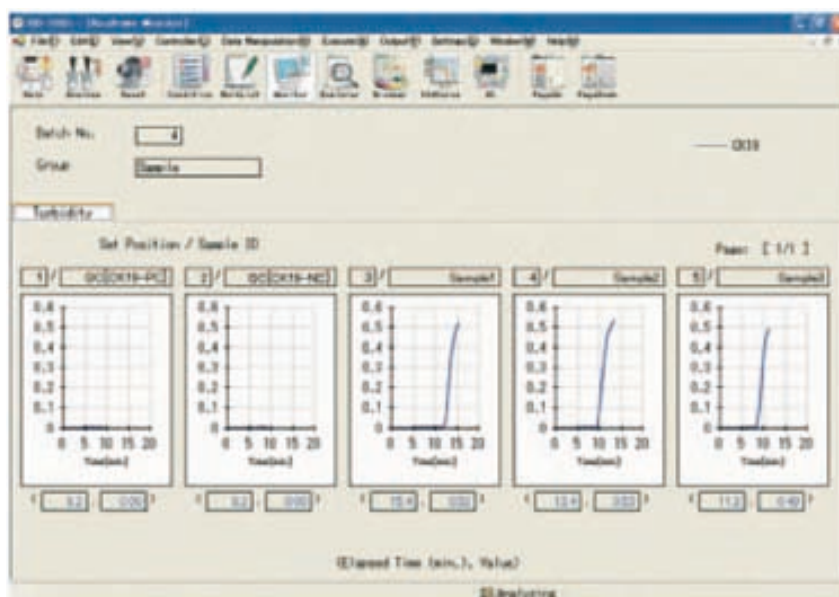


Figura 9: Técnica OSNA. Captura de pantalla de la RD.100i mostrando los resultados en tiempo real durante el proceso molecular.

Batch No.	Date	Sample ID	CK19 Q.	Lot No.	CK19 C.	CK19
1	2006/05/03	Cal[C1]	(+)	G005	1.9E+03	12.0
1	2006/05/03	Cal[C1]	(+)	G005	1.9E+03	12.0
1	2006/05/03	Cal[C2]	(++)	G005	4.1E+05	10.6
1	2006/05/03	Cal[C2]	(++)	G005	4.1E+05	10.6
1	2006/05/03	Cal[C3]	(++)	G005	1.9E+07	9.6
1	2006/05/03	Cal[C3]	(++)	G005	1.9E+07	9.6
1	2006/05/03	OC[CK19-PC]	(++)	G005	6.1E+03	11.7
1	2006/05/03	OC[CK19-NC]	(-)	G005	<2.5E+02	ND

Identificación
de la
muestra

Resultado
semi-
cuantitativo

Número de copias
de CK19 en μL de
cada muestra

Figura 10: Técnica OSNA. Captura de pantalla del ordenador adaptado a la RD.100i mostrando los resultados del proceso molecular con la cantidad de CK19 de cada muestra en números de copias y el resultado semicuantitativo representado en OSNA (-), OSNA (+) y OSNA (++)

1.6 Estudios de validación de la técnica OSNA

Varios estudios han demostrado que la técnica OSNA permite detectar con precisión metástasis del GC de pacientes con cáncer de mama, con una frecuencia comparable al del examen patológico convencional.^[94-98]

Todos los estudios utilizaron una metodología similar con el estudio histológico como patrón para las comparaciones con la técnica OSNA. Como es de suponer, el tejido utilizado para los ensayos moleculares no puede ser utilizado para realizar el estudio histológico. De la misma forma en que el tejido una vez fijado en formaldehído e incluido en parafina para el estudio histológico mediante la técnica de H&E no es adecuado para aplicar técnicas moleculares como la amplificación de ARNm. Se ha demostrado que el formaldehído produce entrecruzamiento («cross-linkage») entre ácidos nucleicos y proteínas, hidroliza puentes fosfodiéster del ADN y modifica covalentemente el ARN por adición de grupos mono-metilos en las bases generando problemas en la obtención de material genético de buena calidad necesario para la aplicación de variadas técnicas moleculares.

Por esta razón, en los estudios de validación de la técnica, los ganglios linfáticos se han dividido en piezas con aproximadamente la mitad del volumen de los ganglios linfáticos sometidos a una prueba y la otra mitad utilizada para la otra (figura 11).

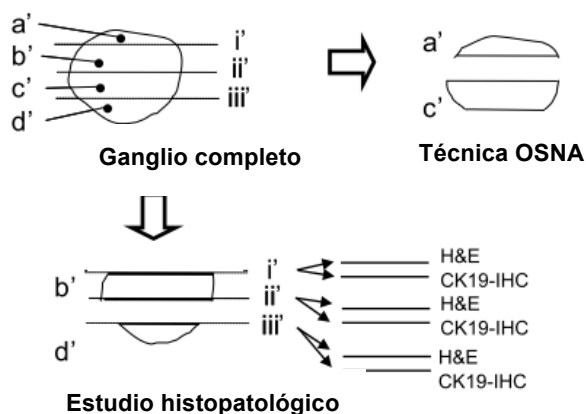


Figura 11: Técnica de validación de la técnica OSNA utilizada en el estudio de Tsujimoto et al.^[93] Cada ganglio linfático fue seccionado en bloques cada 1 a 2 mm y de forma alternada fueron procesados para el estudio histopatológico (H&E e IHC) y la técnica OSNA. Modificado a partir de Tsujimoto et al.^[93]

Es de suponer que el estudio de la mitad de un ganglio linfático mediante una técnica y la otra mitad mediante una técnica diferente puede dar lugar a resultados discrepantes simplemente sobre la base de la distribución espacial de la metástasis presente en el mismo.^[99] Las metástasis habitualmente no se distribuyen de manera aleatoria en los ganglios linfáticos situándose generalmente cerca del canalículo aferente de drenaje linfático hacia el tumor.^[100, 101] Este sesgo de muestreo de diferentes partes de los ganglios linfáticos estudiados por diferentes pruebas diagnósticas se ha reconocido como una fuente importante de discrepancia en la interpretación de los resultados. De esta forma, para minimizar este hecho, todos los estudios utilizaron múltiples secciones de entre 1 a 2 mm de grosor estudiados de forma alternada mediante histología y la técnica OSNA.

Los resultados evidenciaron casos concordantes en la mayoría de las muestras los cuales no requirieron estudios suplementarios. Sin embargo, los resultados discordantes fueron sometidos a nuevas pruebas para su resolución, a partir de

nuevas técnicas histológicas (nuevos cortes de los bloques de parafina ó técnicas de IHQ, en los casos en los que no se habían realizado) ó nuevas técnicas moleculares del lisado de las muestras almacenadas a menos 80°C; incluyendo técnicas de Western Blot para CK19 para demostrar la presencia de la misma en la muestra, repetición de la técnica OSNA para probar posibles fallos técnicos, ó RT-PCR cuantitativa después de la extracción total de ARNm.

Los casos discordantes que por su determinación por Western Blot o resultados cuantitativos RT-PCR fueron concordantes con el resultado de la técnica OSNA inicial (ya sea tanto ambos negativos o ambos positivos) fueron interpretados como probablemente debidos a sesgo de asignación de tejido (tissue allocation bias, TAB), y se excluyeron del análisis estadístico. Las discordancias debidas a interpretaciones erróneas del estudio histopatológico ó las derivadas a errores en el muestreo no fueron excluidas.

La tasa de concordancia global entre la histología y la técnica OSNA, evaluada mediante estudio alternado de secciones múltiples del ganglio linfático, es mayor del 96%.^[102] De los resultados discrepantes, el 40% ha sido atribuido a TAB, sin embargo, muestreos extras en ganglios de escaso volumen no permiten descartar que sea aún mayor. De hecho, varios de los resultados discordantes evidenciaron metástasis de muy bajo volumen ganglionar, ya sea por histología (pequeñas micrometástasis ó resultados negativos evidenciados por IHQ como células tumorales aisladas); ó por técnica OSNA (resultados de CK19 con copias cercanas al punto de corte de positividad de 250 copias/ μ l) (tabla 1).

Si se excluye el estudio de Tamaki et al.,^[96] donde no se discriminan cuantitativamente los casos de OSNA positivos si son micrometástasis o macrometástasis, se evidencia que de los 203 resultados discordantes iniciales 142 (el 70%) eran micrometástasis por histología (41) u OSNA + por técnica OSNA (101), en la mayoría interpretados como TAB (87) lo que explica que la técnica OSNA puede detectar compromiso ganglionar de menor volumen que la técnica histológica.

Tabla I: Resultados de las diferentes series de validación de la técnica OSNA. Modificado a partir de Cserni et al.^[102]

	n	TAB	H&E+ OSNA+	H&E- OSNA-	H&E+ OSNA-	H&E- OSNA+	SENS	ESPC	ACC	VPP	VPN	TFN	FRR
Tsujimoto ^[93]	323	2	43	276	2	2	95,6	99,3	98,8	95,6	99,3	4,4	0,7
Visser ^[94]	339	7	61	267	3	8	95,3	97,1	96,8	88,4	98,9	4,7	1,1
Schem ^[95]	330	13	104	211	0	15	100	93,4	95,5	87,4	100	0	0,7
Tamaki #1 ^[96]	124	0	19	101	1	3	95	97,1	96,8	86,4	99,3	5	1,1
Tamaki #2 ^[96]	440	10	70	348	2	20	97,2	94,6	95,5	77,8	99,4	2,8	0,6
Snook ^[97]	395	17	66	313	6	10	91,7	96,9	95,9	86,8	98,1	8,3	1,9
Feldman ^[98]	1025	19	107	868	30	20	78,1	97,7	95,1	84,3	96,7	21,9	3,3
Bernet ^[103]	174	7	33	138	1	2	97,1	98,6	98,3	94,3	99,3	2,9	0,7
Le Frère-Belda ^[104]	481	22	51	413	5	12	91,1	97,2	96,5	81	98,8	8,9	1,2
Total	3631	97	554	2935	50	92	91,7	97	96,1	85,8	98,3	8,3	1,7

n = representan muestras de ganglios linfáticos.

+ = positivos (incluyendo micrometástasis / macrometástasis para histología y + / + + resultados de OSNA).

- = negativos (incluyendo los casos negativos por histología y por OSNA con < 250 copias, incluyendo las células tumorales aisladas).

SENS = sensibilidad en %.

ESPEC = especificidad en %.

ACC = accuracy, precisión (tasa de concordancia de las dos pruebas).

VPP = valor predictivo positivo en %.

VPN = valor predictivo negativo en %.

TFN = tasa de falsos negativos (falsos negativos / todos positivos) en %.

FRR = false reassurance rate (falsos negativos / todas las pruebas negativas) en %.

HIST = estudio por histología.

TAB = sesgo de asignación del tejido (muestras que se excluyeron del análisis).

La tasa de falsos negativos de la técnica OSNA en comparación con la histología convencional se encuentra dentro del límite generalmente tolerado del 10% (del 8,3% en la recopilación de los estudios de validación), con un valor predictivo negativo alto del 98,3% y con una tasa de falsa tranquilidad (False-reassurance rate) aún más baja del 1,7% (tabla 1). Es decir, que ante una prueba negativa de la técnica OSNA, la probabilidad de que esta no sea cierta es del 1,7%. Por otro lado, el resultado negativo de la técnica OSNA podría ser un falso negativo en aquellos raros casos en los que el tumor mamario primario no exprese la CK19. Está demostrado que el 98,2% de los cánceres de mama independientemente del tipo histológico expresan la CK19 evidenciada mediante técnicas de IHQ^[105] lo que sugiere confirmar dicha positividad en el material de la biopsia preoperatoria de los pacientes a los cuales se aplique esta técnica de diagnóstico intraoperatorio para descartar este raro fenotipo.

En cuanto a los resultados de falsos positivos, la técnica OSNA evidenció que 2,5% de los pacientes presentaban resultado positivo sin afectación ganglionar demostrable en la histología después de descartar los casos discordantes atribuibles a TAB. Esta proporción de tasa de falsos positivos es razonablemente baja. La mayoría de los casos, el 75%, pertenecían a resultados positivos de bajo volumen (OSNA +) que potencialmente puede no ser evidenciado por histología o estar representados sólo como CTA. Otras causas más raras aún de falsos positivos pueden ser las inclusiones ganglionares de células epiteliales benignas. La mayoría de ellas son pequeñas, alrededor del tamaño, volumen o número de células de las CTA y lo más probable es no ser detectados por OSNA, y si las detecta, ésta sería en niveles de CK19 inferiores al límite de corte para un resultado positivo de la técnica OSNA.^[106]

A partir de estos estudios que demuestran que la técnica OSNA es más sensible y casi tan específica como el estudio histopatológico convencional, varios centros distribuidos en todo el mundo han adoptado esta técnica dentro de la práctica clínica habitual.^[97, 103, 107-110] A diferencia de las técnicas de muestreo para los estudios de validación, algunos centros realizan una sección central del ganglio de 1 mm para estudio histológico y el resto del ganglio entero lo destinan a la técnica OSNA lo que permite tener la mayor cantidad de tejido para la técnica más sensible, dejando una representación del mismo para una evaluación morfológica básica y mínima de las metástasis más grandes y los cambios no metastásicos en el ganglio linfático.^[110] Otros centros realizan una impronta citológica antes de la homogeneización completa del ganglio.^[108] La tasa de detección de GC positivos de la técnica OSNA publicada fuera de los estudios de validación esta entre el 14,7% (excluyendo las CTA),^[109] 21,3%,^[108] 22,8%,^[107] y el 29,1%.^[110] Por otro lado, si bien la frecuencia de resultados del GC negativos en series comparativas de poblaciones pareadas estudiadas mediante estudio histológico convencional ó técnica OSNA ha sido similar se detectan más casos de micrometástasis mediante la técnica OSNA (18% vs 8%) y menos macrometástasis (11% vs 20%) que en la histología, diferencias no estadísticamente significativas con IC de 95% que se superponen.

La frecuencia de afectación de ganglios no centinela en la LA complementaria después de GC positivos evaluados mediante la técnica OSNA es similar a la publicada en los estudios realizados mediante histología convencional. Si bien los datos son de series pequeñas, en el estudio de Khaddage et al.^[108] la frecuencia era del 54% después de OSNA ++ y del 10% después de OSNA +. Resultados similares publicó el grupo de Turin, el 42% y el 22% de las pacientes presentaban otros ganglios no centinela afectados después de una macrometástasis ó micrometástasis por OSNA, respectivamente.^[110]

Se ha descrito que la técnica OSNA puede sufrir inhibición del proceso; situación en la que es imposible la cuantificación de las metástasis debido a una interferencia de la reacción molecular por lo que no puede categorizarse si se trata de OSNA + u OSNA ++. Los mecanismos de interferencia que generan la inhibición son desconocidos. En el estudio multicéntrico realizado en el Reino Unido se describe un fallo de la técnica de detección del sistema OSNA del 1,4%.^[97] En estos casos, al haber realizado la homogeneización completa del ganglio para el estudio molecular no se dispone de material para estudio histológico y para definir el tamaño de la metástasis. En la actualidad, la única solución para esta eventualidad consiste en cuantificar la metástasis con inhibición utilizando otras técnicas moleculares, después de la extracción y purificación de ARNm, para eliminar las interferencias. Esta situación, si bien es rara, debe ser tomada en cuenta y debe tener un protocolo de acción para poder resolverla. Los casos que no pueden ser clasificados como macrometástasis o micrometástasis debido a inhibición del proceso deben ser excluidos de la linfadenectomía axilar inmediata.

En resumen, la técnica OSNA en cáncer de mama ofrece:

- Un análisis estandarizado de las metástasis en los ganglios linfáticos.
- Tiempos cortos de análisis que permiten su utilización intraoperatoria.
- Evaluación completa de todo el tejido ganglionar.
- Análisis exacto y reproducible del ganglio linfático.
- Funcionamiento automatizado incluso para usuarios sin conocimientos de biología molecular.

1.7 Predicción de afectación axilar después de un GC positivo

La probabilidad de encontrar un GC afecto en pacientes con estadios precoces sin evidencia clínica de enfermedad ganglionar es del 20% al 30%.^[111, 112] Es más, la incorporación en la última década de la punción por aspiración con aguja fina de ganglios regionales sospechosos por ecografía ha reducido la tasa de ganglios centinela positivos del 26 al 15%, mejorado la selección de pacientes para la BSGC.^[72]

El alto valor predictivo negativo de la biopsia selectiva del GC, al no realizarse la linfadenectomía axilar complementaria, permite que la morbilidad asociada a la misma pueda ser evitada con seguridad oncológica demostrada.^[52] Una vez aceptado que cuando el GC es negativo no es necesaria una LA, la cuestión reside en si las pacientes con afectación del GC se benefician de una LA. Está demostrado que en el 60 - 70% de las veces el GC es el único ganglio positivo en la axila.^[40, 113] Por tanto, en este grupo de pacientes la LA sólo aportaría morbilidad sin tener beneficio terapéutico.

La distribución de la enfermedad metastásica axilar (ganglio centinela frente a los ganglios no centinela) parece ser un determinante importante del pronóstico de las pacientes independientemente del número de ganglios linfáticos afectados en total. Hay evidencia de que el número de ganglios linfáticos regionales que participan en la enfermedad metastásica no afectan significativamente el pronóstico, si toda esta carga tumoral metastásica se limita a los ganglios centinela.^[114]

La incidencia de afectación tumoral de ganglios linfáticos axilares no centinela cuando el GC es positivo varía entre 40-60%.^[113] Dada la variabilidad en la frecuencia de enfermedad axilar adicional, se han realizado múltiples estudios para identificar las variables clínico-patológicas predictivas de la afectación metastásica de los ganglios linfáticos no centinela en un intento de seleccionar a aquellos pacientes que se beneficiarían de la realización de una LA complementaria. Estos estudios han demostrado que diferentes características

patológicas del tumor primario y del GC se asociarían con una mayor probabilidad de presentar otros ganglios no centinela afectados.

Un estudio multicéntrico holandés realizado en más de 500 pacientes con cáncer de mama con GC positivo identificó tres factores predictivos de metástasis de ganglios no centinela: el tamaño de la metástasis del GC, el tamaño del tumor primario, y la invasión linfovascular.^[115] En este sentido, en el meta-análisis de van la Parra et al.^[116] sobre los factores predictivos de no afectación metastásica de ganglios no centinela en pacientes con cáncer de mama con GC positivo se identificaron ocho factores predictivos: el método de detección anatomopatológico (H&E), el tamaño de la metástasis del GC > 2 mm, la extensión extracapsular del GC, más de 1 GC positivo, un GC negativo aparte del GC positivo, la proporción de GC positivo > 50% de los GC resecados, el tamaño del tumor > 2 cm, y la invasión linfovascular en el tumor primario.

Otros grupos han desarrollado modelos matemáticos o nomogramas para predecir el estado de los ganglios linfáticos no centinela en pacientes que presenten GC afectados. Los defensores de estos modelos sugieren que la LA complementaria sólo sería útil en aquellos pacientes que presentan mayor probabilidad de tener enfermedad ganglionar adicional. El modelo más utilizado es el nomograma desarrollado por Van Zee et al.^[117] en el Memorial Sloan-Kettering Cancer Center de New York. Por otro lado, el nomograma del MD Anderson de Houston (Texas) ha incorporado el tamaño de la metástasis del GC después de demostrar que actúa como predictor independiente de afectación de ganglios no centinela.^[118]

Todos estos estudios en los que se incluye el tamaño de la metástasis del GC están basados en el diámetro máximo de la metástasis diferenciados en células tumorales aisladas, micrometástasis ó macrometástasis.^[26] Sin embargo tanto estos como otras publicaciones al respecto,^[115, 119] realizan el estudio del GC con diferentes protocolos de anatomía patológica, en los cuales las secciones ganglionares se realizan a diferentes distancias con la inclusión o no de técnicas

de IHQ, lo que hace que la reproducibilidad y aplicabilidad de los mismos sea discutible.

Contrariamente a lo que se pensaba, las recidivas en los pacientes con GC positivo que no se someten a una LA complementaria no son altas. Naik et al.^[120] ha tratado de identificar la tasa de recidiva axilar en un grupo de 4.008 pacientes con cáncer mama tras ser estudiados mediante la técnica del GC. En el análisis por subgrupos de los pacientes que tuvieron GC positivo y que no se realizó la LA complementaria, 3 de 210 (1,2%) presentaron recidivas axilares que se produjeron entre 11 y 46 meses después del diagnóstico. En este estudio no se reportó el tamaño de la metástasis del GC pero puede haber variado ampliamente debido a que el método de detección varió entre técnicas de IHQ hasta cortes por congelación y secciones múltiples teñidas con H&E. En el estudio de Hwang et al.^[121] realizado en 196 pacientes con GC positivo que no se sometieron a LA basado en el criterio médico ó la preferencia del paciente no se registraron recidivas axilares con una mediana de seguimiento de 29,5 meses. Solo un paciente tuvo una recidiva ganglionar supraclavicular y tres desarrollaron metástasis a distancia con una mediana de tiempo hasta la recurrencia de 32 meses. La evaluación patológica de los GC dentro de este estudio ha evolucionado en el tiempo con los cambios en la tecnología donde el 36% de las metástasis del GC fueron detectadas solo por IHQ y el 64% mediante tinción con H&E. La cantidad de enfermedad metastásica en el GC era pequeña con un tamaño medio del depósito tumoral en el GC de 1 mm (rango 0,1 a 12,9 mm).

El efecto beneficioso de la terapia sistémica en el control local plantea la posibilidad de que la extensión de la cirugía axilar, con su morbilidad asociada, podría reducirse en pacientes que reciben terapia sistémica. Esta fue la hipótesis planteada por el American College of Surgeons Oncology Group (ACOSOG) en el estudio Z0011, donde pacientes con estadio clínico T1 y T2, con ganglios clínicamente negativos y tratadas con cirugía conservadora de la mama asociada a radioterapia mamaria que tenían metástasis en menos de 3 ganglios centinela fueron randomizadas para completar la disección axilar ó no recibir más tratamiento en la axila. Tras una media de seguimiento de 6,3 años, no hubo

diferencia entre ambos grupos en la tasa de recidiva locorregional, la supervivencia libre de enfermedad o la supervivencia global.^[122, 123]

Estos hallazgos han cambiado parcialmente la práctica clínica habitual, sin embargo, los resultados podrían no ser extrapolables a todas las pacientes con estadios precoces y tratamiento conservador incluidas en el ACOSOG Z0011 dado que es un subgrupo particular de bajo riesgo. Por otro lado, en este estudio están representadas insuficientemente las pacientes jóvenes, el carcinoma lobulillar infiltrante ó los tumores con receptores estrogénicos negativos por lo que en estos subgrupos de pacientes debería hacerse un análisis individualizado del riesgo de afectación axilar extra.

1.8 Incorporación de la expresión génica del tumor primario en la cirugía

En el año 2000, Perou et al.^[124] caracterizaron los patrones de expresión de los genes en 65 tumores de mama utilizando microarrays de ADN mediante la utilización de análisis de expresión génica. De esta forma los tumores se pueden clasificar en cuatro grandes subtipos (basal-like, HER2-enriquecido, normal-like y luminales) determinados por las diferencias que abundan en sus patrones de expresión génica. Este y otros experimentos confirmaron que el cáncer de mama no es una sola enfermedad con características morfológicas variables, sino más bien un grupo de trastornos neoplásicos molecularmente distintos con comportamiento biológico intrínseco de los cuales puede influir en la historia natural y, en consecuencia, la decisión clínica.

En la actualidad, la biología del tumor establecida por las características tumorales y moleculares se utiliza para determinar el pronóstico y la necesidad de terapia sistémica adyuvante tanto para pacientes con ganglios linfáticos positivos como con ganglios linfáticos negativos. Por otro lado, no está demostrado que exista una correlación entre los perfiles génicos del tumor y la toma de decisiones acerca del tipo de cirugía en cáncer de mama.^[125]

1.9 Concepto de la carga tumoral

Alejándose de conceptos dicotómicos como “ganglios positivos ó ganglios negativos” podría definirse el compromiso de los ganglios regionales a partir de una variable semicuantitativa continua como la carga tumoral ganglionar, que va desde una sola célula a voluminosas metástasis palpables. Está demostrado que el pronóstico y la supervivencia de los pacientes es un continuo con la carga tumoral ganglionar cuando todos los demás factores biológicos intrínsecos son iguales.^[72, 126] Harris et al.^[127] demostraron que en pacientes con 1 a 3 ganglios linfáticos positivos sometidos a mastectomía sin radioterapia las metástasis ganglionares mayores de 5 mm se asociaron a recidiva regional después de la mastectomía. El tamaño de la metástasis ganglionar, o su carga tumoral, puede ser útil para identificar pacientes de alto riesgo que podrían beneficiarse de radioterapia después de la mastectomía.

Por tanto, hay una variable que es un factor independiente en la afectación axilar cuando hay un GC positivo y este factor es el tamaño de las metástasis en el GC. De esta forma, la determinación de la carga tumoral en los GC, bien por técnicas patológicas convencionales o bien por técnicas moleculares, resulta un factor decisivo e independiente en el pronóstico de los pacientes y los próximos estudios estarán determinados a poder identificar cual es la carga tumoral de los GC que mejor puede predecir la afectación axilar en los pacientes con cáncer de mama.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

Está demostrado que cuando el ganglio centinela es negativo es representativo del estado de los ganglios linfáticos no centinela con un valor predictivo negativo cercano al 100%. Esto permite evitar la realización de una linfadenectomía complementaria en este grupo de pacientes, sin modificar la tasa de recidiva locorregional ni la supervivencia global.

En la actualidad, gracias a la evidencia de ensayos clínicos randomizados, en pacientes con cáncer de mama cT1-2 cN0, con tratamiento conservador de mama, radioterapia y tratamiento sistémico se ha demostrado que se puede evitar la LA cuando el GC es positivo sin aumentar el riesgo de recidiva locorregional ni empeorar la tasa de supervivencia.

Se han descrito diferentes parámetros clínico-patológicos y marcadores biológicos de predicción de metástasis en los ganglios no centinela de pacientes con ganglios centinela positivos con cáncer de mama.

La incorporación de métodos moleculares mediante la utilización de la técnica OSNA para el estudio de los GC en pacientes con cáncer de mama permite una evaluación completa, rápida, objetiva y estandarizada de los mismos. Mediante esta técnica se obtiene un resultado cuantitativo el cual informa, mediante unos límites de corte preestablecidos, la ausencia de metástasis en los ganglios, ó la presencia de micrometástasis o macrometástasis.

La **hipótesis** de trabajo es determinar cual es el valor de carga tumoral total del ganglio centinela evaluado por la técnica OSNA que predice la ausencia de metástasis en los ganglios axilares no centinela; lo que permitiría no realizar una disección axilar complementaria en casos de ganglio centinela positivo.

Por otra parte, establecer un punto de corte de la carga tumoral total del ganglio centinela positivo obtenida mediante la técnica OSNA que permita predecir, con una alta especificidad, el estado de los ganglios no centinela.

Además, si se demuestra también una implicación pronóstica, podría transformarse en una técnica molecular que permita cambiar el TNM de las pacientes.

2. 2 Objetivos

1. Validar la técnica OSNA en los pacientes con cáncer de mama
 - 1.1 Hacer un estudio comparativo de dos poblaciones analizando el GC con técnicas convencionales y con técnicas moleculares (OSNA). Para ello se analizarán las características de las pacientes y de los tumores.
 - 1.2 Comparar las características generales de la técnica OSNA de cada ganglio centinela en tanto al resultado negativo, micrometástasis o macrometástasis.
 - 1.3 Evaluar la tasa de detección de metástasis de los ganglios centinela mediante la técnica OSNA comparada con la técnica convencional.

2. Estudiar si la carga tumoral total de metástasis de ganglio centinela de pacientes con cáncer de mama expresada en el número de copias de ARNm de la citoqueratina 19 obtenida mediante la técnica OSNA tiene valor predictivo de la ausencia de metástasis del resto de los ganglios axilares.
 - 2.1. Examinar las características generales de las pacientes. Estudiar las características generales de los tumores en tanto al tamaño del tumor, a su tipo histológico, al grado histológico, la presencia de receptores hormonales, la sobreexpresión de Her2/neu, la presencia de invasión linfovascular y el índice de proliferación tumoral expresado mediante el Ki67.
 - 2.2. Hacer un estudio univariado y multivariado con las diferentes variables que predicen la afectación del GC.

3. Comprobar si la carga tumoral total obtenida de la técnica OSNA se comporta como variable independiente comparada con todas las otras variables previamente mencionadas de predicción de ganglios no centinela afectados.

4. Definir cuál es el límite de corte de carga tumoral total que presente una especificidad con un valor predictivo negativo de utilidad clínica de predicción de ganglios no centinela afectados.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Tipo de estudio

Se trata de un estudio de cohortes transversal que comprende dos fases. La primera fase consiste en un estudio de cohortes retrospectivo de validación de la técnica OSNA comparándola con la técnica convencional (gold standard). La segunda fase consiste en un estudio prospectivo donde se evalúa la utilidad clínica de la carga tumoral total obtenida mediante la técnica OSNA. Los datos se obtuvieron de la Unidad de Patología Mamaria, Centro de Cáncer de Mama del Hospital Universitario Vall d'Hebron de Barcelona y la Unidad de Patología Mamaria del Hospital Universitario Clínico de Salamanca.

En la **primera fase** se evaluaron las pacientes tratadas en forma consecutiva, entre abril y diciembre de 2010, que presentaban cáncer de mama en estadio clínico cT1-3, con estadio clínico ganglionar negativo (cN0), confirmado por ecografía axilar, en las cuales se utilizó de forma exclusiva la técnica OSNA para la evaluación intraoperatoria anatomopatológica del ganglio centinela (cohorte de casos). Este grupo de pacientes se comparó con una cohorte control, compuesta por pacientes tratadas los seis meses previos a la cohorte de casos, pareada con el mismo estadio clínico y criterios de exclusión, en las cuales se utilizó la técnica convencional para el estudio intraoperatorio anatomopatológico del ganglio centinela.

En la **segunda fase** se estudió las pacientes tratadas en forma consecutiva, entre abril de 2010 y junio de 2011, que presentaban cáncer de mama en estadio clínico cT1-3 con estadio clínico ganglionar negativo (cN0), confirmado por ecografía axilar, en las cuales se utilizó de forma exclusiva la técnica OSNA para la evaluación intraoperatoria anatomopatológica del ganglio centinela.

En esta segunda fase se analizó la carga tumoral de los GC mediante la técnica OSNA y se determinó el punto de corte de la carga tumoral en la predicción de la afectación del resto de los ganglios axilares.

3.2 Primera Fase (F1)

3.2.1 Criterios de inclusión F1

En la primera fase del estudio se incluyeron pacientes con cáncer de mama invasivo con los siguientes criterios:

- CK19 positiva en la biopsia preoperatoria del tumor.
- Estadio clínico tumoral determinado por examen físico o por imágenes (ya sea mamografía, ecografía mamaria o resonancia magnética mamaria) como cT1 a cT3.
- Estadio clínico ganglionar cN0 determinado por examen físico (la ausencia de adenopatías palpables sospechosas en territorios ganglionares axilares, supraclaviculares e infraclaviculares); confirmado mediante estudio ecográfico preoperatorio. También se incluyeron como cN0 las pacientes con examen clínico ganglionar negativo que presentaban ecografía axilar sospechosa preoperatoria, en las cuales la punción con aspiración con aguja fina (PAAF) del ganglio sospechoso fue negativa.
- Evaluación intraoperatoria del ganglio centinela.
- Ausencia de metástasis a distancia M0.

La clasificación TNM se obtuvo de la AJCC^[26] en su última edición.

3.2.2 Criterios de exclusión F1

Los criterios de exclusión fueron los siguientes:

- Pacientes en las que presentaban CK19 negativa en la biopsia preoperatoria del tumor mamario.
- Diagnóstico preoperatorio de carcinoma ducal in-situ exclusivo en la biopsia preoperatoria.
- Pacientes tratadas con quimioterapia neoadyuvante.
- Pacientes con recidiva de cáncer de mama ipsilateral.

3.2.3 Técnica de biopsia selectiva del ganglio centinela

El día antes de la cirugía se inyectó a nivel subareolar 1,5 mCi/ml de radiocoloide Tecnecio99. Después de la inyección se esperó aproximadamente una hora, con el objetivo de dar tiempo a la migración del radiotrazador a los ganglios centinela. Posteriormente, se realizó una linfogammagrafía para evaluar el drenaje axilar del marcador e identificar el drenaje axilar ó drenajes extra axilares del trazador que determinasen, tanto en cantidad como su localización y relación con estructuras anatómicas, los ganglios centinela posibles presentes. Para la interpretación de las imágenes se utilizó por parte del Servicio de Medicina Nuclear tanto las imágenes planares como las obtenidas mediante el estudio SPECT-TAC.

Procedimiento quirúrgico:

La técnica empleada ya fue descrita por nuestro grupo previamente.^[128] En el momento de la cirugía antes de la incisión cutánea se utilizó una sonda gamma (Europrobe3[®], Eurorad, Strasbourg, Francia) detectora de rayos gamma para identificar los puntos calientes que representan la ubicación del ganglio centinela a nivel axilar (ó a nivel extra axilar si en el estudio mediante la linfogammagrafía preoperatoria así lo ponía en evidencia). Un punto caliente se define como un área de radiactividad independiente del sitio de la inyección del marcador radiactivo.

Después de la colocación de los campos quirúrgicos se detecta mediante la sonda gamma la zona de mayor radiactividad percutánea a fin de orientar la incisión cutánea. Tras realizar la incisión cutánea en la axila se procede a la apertura de la fascia axilar y a la búsqueda del sitio de mayor radiactividad dentro de la axila mediante la sonda gamma con la finalidad de dirigir la disección del tejido graso-linfático. Se realiza la exéresis de todos los ganglios que presentan una radiactividad superior al 10% del ganglio de mayor actividad. En los casos en los que se extirparon más de un ganglio, estos fueron separados uno de otros y enviados por separado en fresco a anatomía patológica para su estudio intraoperatorio. Posteriormente se realizó una minuciosa comprobación de la ausencia de cualquier foco de radiactividad residual en el lecho operatorio (mayor

al 10% del ganglio centinela con mayor actividad en ex-vivo), como así también de la presencia de adenopatías macroscópicamente sospechosas (redondas, duras y aumentadas de tamaño) mediante palpación. Ante ganglios que a la palpación intraoperatoria sean sospechosos de metástasis sin actividad radiactiva, se extraen y se estudian de forma intraoperatoria como ganglios centinela palpables.

Posteriormente se realiza el tratamiento planeado de la mama, ya sea mediante tumorectomía o mastectomía.

Si la evaluación intraoperatoria del ganglio centinela demuestra la presencia de micrometástasis o macrometástasis en el mismo se procede a la linfadenectomía axilar del nivel I y II de Berg. En las pacientes en las que el estudio del ganglio centinela mediante la técnica OSNA fue positivo, la LA complementaria se llevó a cabo durante el mismo acto quirúrgico, mientras que en aquellas pacientes en las cuales el estudio intraoperatorio del ganglio centinela fue negativo mediante la técnica convencional, pero demostraba metástasis en el estudio patológico diferido, la LA se realizó en una segunda intervención quirúrgica.

3.2.4 Estudio anatomopatológico de los ganglios centinela y axilares

Evaluación del ganglio centinela mediante la técnica convencional

En el laboratorio de anatomía patológica la evaluación intraoperatoria del ganglio centinela se realizó mediante la combinación de impronta citológica y estudio por congelación de secciones seriadas a la que denominaremos en adelante como “técnica convencional (TConv)”. El procedimiento consiste en la sección de cada ganglio a nivel central para la realización de una impronta citológica; y secciones seriadas aproximadas cada 2 mm para la congelación de una de las caras y su tinción con la técnica de H&E; ambas evaluaciones realizadas por el patólogo. El resultado se obtiene al cabo de 25-30 minutos y es informado por el patólogo durante la intervención quirúrgica tanto la cantidad de ganglios estudiados como

el resultado de cada uno de ellos como negativo ó positivos (la presencia de micrometástasis ó macrometástasis).

De forma diferida se realizó el estudio completo de los ganglios centinela mediante sección del material remanente cada 100-150 μm y su posterior tinción con la técnica H&E. Si el resultado demostró la ausencia de compromiso metastásico de los ganglios, se realizó en forma complementaria estudio IHQ. El resultado del estudio definitivo del ganglio centinela fue informado por el patólogo tanto la cantidad de ganglios estudiados como el resultado de cada uno de ellos como negativo, ó la presencia de micrometástasis ó macrometástasis; resultado que podía coincidir o discrepar con el resultado del estudio intraoperatorio.

Evaluación del ganglio centinela mediante la técnica OSNA

Se realizó en el laboratorio de anatomía patológica. El procesamiento de la muestra fue llevado acabo por el patólogo asistido por un técnico manteniendo en todo momento las medidas de asepsia para evitar contaminación de la muestra con ARN. Cada ganglio se procesó de manera independiente. El procedimiento inicial consistió en la resección de la grasa periganglionar la cual se procesó en diferido en forma independiente si el resultado del estudio ganglionar demostró compromiso metastásico con el objetivo de determinar la presencia de invasión extracapsular.

A continuación se procedió a homogeneizar en un reactivo especial de forma completa, todo el ganglio ó los ganglios linfáticos extraídos, y la fase líquida resultante se introdujo en la maquina RD-100i que realiza el estudio totalmente automatizado, mediante pipeteo, amplificación y detección de ARNm de la CK19. El tiempo total necesario desde el inicio de la preparación del ganglio linfático hasta la obtención de los resultados fue de aproximadamente 30 minutos para un ganglio linfático y 40 minutos para 4 ganglios linfáticos.

Los ganglios linfáticos que superaron el peso máximo especificado de 600 μg fueron cortados en dos o más piezas y se procesaron como ganglios

independientes. Hasta cuatro ganglios linfáticos se analizaron en una sola tanda de la RD-100i.

El dispositivo fue calibrado para distinguir como positivas para tumor metastásico las muestras que contenían \geq de 250 copias/ μ L de ARNm de CK19. Los resultados se visualizaban en tres categorías diferentes (-), (+) y (++), en relación directa con el número de copias de ARNm CK19 expresado en copias por μ L. Los valores de corte, la calibración del sistema, y el cálculo del nivel de ARNm de la CK19 de la muestra fue determinado por la RD-100i mediante un sistema de control de resultados positivos y negativos para determinar si había problemas de contaminación.

Según el número de copias/ μ L de ARNm de la CK19 calculado por la RD-100i, de acuerdo al nivel de corte determinado por Tsujimoto et al.^[93] en el estudio clínico de desarrollo de la técnica, el resultado intraoperatorio informado por el patólogo fue la cantidad de ganglios estudiados y el resultado de cada uno de ellos como:

- negativo ($<2,5 \times 10^2$ copias/ μ L)
- micrometástasis ($2,5 \times 10^2$ a 5×10^3 copias/ μ L)
- macrometástasis ($>5 \times 10^3$ copias/ μ L).

El resultado informado por el patólogo en el estudio intraoperatorio mediante la técnica OSNA era el resultado definitivo del estudio del ganglio centinela.

Estudio histológico de la linfadenectomía axilar

Todos los ganglios linfáticos obtenidos en la linfadenectomía se seccionaron por la mitad a lo largo del eje mayor después de su fijación en formaldehído. Una vez procesados, una de las superficies de corte se examinó mediante la técnica de H&E. No se realizaron técnicas de IHQ para la evaluación de los ganglios linfáticos axilares no centinela. El total de ganglios linfáticos examinados, centinela y no centinela se clasificaron según el TNM de la última versión de la AJCC.^[26]

3.2.5 Estudio anatomopatológico del tumor de mama

El estudio histológico del tumor primario de la mama se realizó con la pieza operatoria enviada en fresco al Servicio de Anatomía Patológica.

El tamaño tumoral patológico se determinó midiendo el tumor macroscópico en la pieza operatoria expresado en milímetros. A partir del mismo se informó el tamaño tumoral patológico según la clasificación actual de la AJCC.^[26]

El tipo histológico de los tumores fue determinado siguiendo la clasificación actual del cáncer invasivo de mama definido por la Organización Mundial de la Salud.^[129] Para simplificar el estudio estadístico se realizó una agrupación de los diferentes tipos histológicos en tres categorías: carcinoma ductal infiltrante, carcinoma lobulillar infiltrante, y otros, que incluyen todos los otros tipos histológicos.

El grado histológico de los tumores se realizó siguiendo las recomendaciones del sistema de clasificación Scarff-Bloom-Richardson,^[130] determinando el grado uno, el grados dos y el grado tres.

Los otros parámetros estudiados en el tumor primario fueron los receptores de estrógeno (RE), los receptores de progesterona (RP) y la sobreexpresión de Her2/neu siguiendo las definiciones recomendadas por la Asociación Americana de Oncología Clínica y el Colegio Americano de Patólogos.^[131] Se consideró como receptores positivos la presencia de más del 1% de células teñidas en el estudio IHQ y como Her2 positivo la presencia de 3+ en el estudio IHQ ó la positividad de la técnica FISH en los casos con estudio inmunohistoquímico 2+. El índice de proliferación Ki67 fue estudiado siguiendo las recomendaciones internacionales actuales^[132] considerando como un valor alto cuando el Ki67 en el núcleo tumoral fue mayor de 15%.

3.3 Segunda Fase (F2)

3.3.1 Criterios de inclusión F2

En la segunda fase del estudio se incluyeron pacientes con cáncer de mama invasivo que cumpliesen con los mismos criterios de inclusión de la primera fase, es decir pacientes con estadio clínico cT1-cT3 cN0 cM0 en las cuales:

- La evaluación intraoperatoria del ganglio centinela se realizó mediante la técnica OSNA exclusivamente.
- Se realizó una LA complementaria después de la obtención de un resultado positivo del ganglio centinela (macro o micrometástasis).

3.3.2 Criterios de exclusión F2

Los criterios de exclusión fueron los mismo que en la primera fase.

3.3.3 Técnica de biopsia selectiva del ganglio centinela

La técnica de biopsia selectiva del ganglio centinela, tanto el protocolo de inyección e interpretación de imágenes del radiotrazador, como el procedimiento quirúrgico de resección del GC fueron idénticas a la primera fase.

3.3.4 Estudio mediante OSNA de los ganglios centinela

El estudio del ganglio centinela durante la segunda fase se realizó en forma exclusiva mediante la técnica OSNA descrita para la primera fase. El resultado intraoperatorio informado por el patólogo fue la cantidad de ganglios estudiados y el resultado de cada uno de ellos como negativo, micrometástasis o

macrometástasis en función de los puntos de corte de la CK19 descritos para la primera fase; siendo este el resultado definitivo del estudio del ganglio centinela.

3.3.5 Estudio histológico de la linfadenectomía axilar

Todos los ganglios linfáticos obtenidos en la LA se seccionaron por la mitad a lo largo del eje mayor después de su fijación en formaldehído. Se siguió el mismo procedimiento de la primera fase.

3.3.6 Estudio anatomopatológico del tumor de mama

El estudio histológico del tumor primario de la mama se realizó siguiendo las mismas directrices de la primera fase.

3.3.7 Cálculo de la carga tumoral total

A partir de la técnica OSNA se obtuvo el resultado de cada uno de los ganglios centinela considerados positivos independiente de si eran micrometástasis o macrometástasis expresada en copias/ μ L. La carga tumoral total (Total Tumoral Load - TTL) fue definida como la suma de dichos resultados. Por lo cual la TTL representa la carga tumoral presente en los GC metastásicos en su totalidad expresada como una única variable en copias/ μ L.

3.3.8 Clasificación de subtipos moleculares intrínsecos

La clasificación de los subtipos moleculares intrínsecos se realizó siguiendo las recomendaciones de las publicaciones de Perou et al.,^[124] Prats et al.^[133] y Cheang et al.^[134] teniendo en cuenta el estado de los receptores hormonales, la

sobreexpresión de Her2/neu y el índice de proliferación Ki67. De esta manera se determinaron los subtipos moleculares: Luminal A: receptores de estrógeno y progesterona positivos, no sobreexpresión de Her2/neu y el Ki67 igual o menor del 15%; Luminal B: los receptores de estrógeno y progesterona positivos, no sobreexpresión de Her2/neu y el Ki67 > 15%; subtipo Her2: sobreexpresión de Her2/neu independientemente del estado de los receptores y el Ki67; y el subtipo triple negativo: receptores hormonales negativos y no sobreexpresión del Her2/neu.

3.4 Análisis estadístico

La recogida de datos se realizó mediante una base de datos conjunta en Microsoft Excel para Windows en forma retrospectiva en la primera fase y prospectiva durante la segunda fase. Los datos recogidos de cada paciente fueron: la edad, el tamaño del tumor, el grado histológico del tumor, los receptores hormonales de estrógeno y progesterona, agrupados en receptores hormonales (RH), la sobreexpresión de Her2/neu, el estado de Ki67, ILV en el tumor primario, el número total de ganglios centinela resecados, el número total de ganglios no centinela resecados, el número de ganglios centinela y no centinela que fueron positivos y negativos, el tipo de metástasis presentes en los ganglios centinela (micrometástasis o macrometástasis), y en la población de la segunda fase, el valor de CK19 del ARNm determinado por la técnica OSNA de cada ganglio centinela positivo expresado en copias/ μ L.

Las frecuencias para las variables cualitativas se expresaron mediante la media con su respectivo rango; mientras que las variables continuas se expresaron mediante la mediana con su rango intercuartilo (IQR), que depende del percentilo 25th y 75th, ó mediante la media también con su respectivo rango de máximos y mínimos. Para la comparación entre los ganglios centinela positivos y negativos se utilizó los test de Chi-cuadrado y test de U de Mann-Whitney.

Se realizó un estudio de regresión logística paso a paso para los diferentes factores de riesgo para determinar si había diferencias entre los grupos evaluados mediante la técnica convencional y la técnica OSNA en la detección de metástasis en los ganglios centinela estudiados intraoperatoriamente.

En segundo tiempo se realizó un estudio de regresión logística univariado y multivariado en el grupo de la segunda fase, entre las pacientes que presentaron ganglios no centinela positivos después de un diagnóstico positivo del ganglio centinela mediante la técnica OSNA.

Se realizó un estudio de la carga tumoral total (TTL) mediante su conversión al \log^{10} (por la gran dispersión de los valores absolutos). Se realizó un estudio de regresión logística para evaluar la influencia de la carga tumoral total como variable independiente en la presencia de metástasis en ganglios no centinela. Se confeccionó una curva ROC (acrónimo de “Receiver Operating Characteristic”) y se determinó el área bajo la curva (Area Under the Curve, AUC) con el objetivo de identificar mejor el punto de corte de la carga tumoral total que predice la presencia de metástasis en ganglios no centinela.

En todos los análisis se utilizó un valor de p menor de 0,05 para indicar la presencia de significación estadística. El análisis estadístico se realizó en SPSS para Windows (SPSS v17.0, Chicago, EE.UU.) y STATA 11.2 (StataCorp, College Station, TX, EE.UU.).

4. RESULTADOS

4.1 RESULTADOS DE LA PRIMERA FASE (F1)

4.1.1 Características generales de la población F1

En la primera fase del estudio se evaluó una cohorte de 609 pacientes que cumplían los criterios de inclusión y exclusión tratadas en forma consecutiva. El estudio convencional del ganglio centinela se realizó en 303 pacientes (cohorte de casos control) entre octubre de 2009 y marzo de 2010, mientras que el estudio intraoperatorio del ganglio centinela mediante la técnica OSNA se realizó en 306 pacientes (cohorte de casos), entre abril y diciembre de 2010.

La **edad media** de la población estudiada fue de 60,8 años con un rango entre 28 y 95 años. En 181 pacientes (29,7%) la edad al diagnóstico fue < 50 años, mientras que en 428 pacientes (70,3%) fue ≥ 50 años. En el grupo de estudio convencional, 91 pacientes (30%) presentaba una edad < 50 años y 212 pacientes (70%) la edad fue ≥ 50 años. Mientras que en el grupo estudiado por la técnica OSNA, 90 pacientes (29,4%) presentaba edad < 50 años y 216 pacientes (70,6%) edad ≥ 50 años. Estas diferencias no mostraron significación estadística ($p=0,867$) (tabla II - F1).

El **tamaño tumoral** medio de la población, evaluado en el estudio final realizado por anatomía patológica, fue de 17,1 mm (rango, 2 - 90 mm). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de estudio con respecto al tamaño tumoral, presentando una media de 17 mm (rango, 2 - 80 mm) en el grupo de técnica convencional, y de 17 mm (rango, 9 - 90 mm) en el grupo de técnica OSNA ($p=0,20$). La distribución en la población total fue de una paciente (0,2%) con pT1mi, 23 pacientes (3,8%) presentaban pT1a, 134 pacientes (22%) con pT1b, 295 pacientes (48%) con pT1c, 150 pacientes (25%) con pT2 y seis pacientes (1%) con pT3 ($p=0,23$).

El **tamaño tumoral patológico** según los grupos de estudio se distribuyeron de la siguiente forma: en el grupo de técnica convencional, 10 pacientes (3,3%) presentaban pT1a, 77 pacientes (25,4%) pT1b, 145 pacientes (48%) pT1c, 67 pacientes (22,1%) pT2 y 4 pacientes (1,3%) pT3; mientras que en el grupo de técnica OSNA, una paciente presentaba pT1mi (0,3%), 13 pacientes (4,3%)

presentaban pT1a, 57 pacientes (18,6%) pT1b, 150 pacientes (49%) pT1c, 83 pacientes (27,1%) pT2 y dos pacientes (0,7%) pT3 ($p=0,23$).

Las características generales de los tumores de los pacientes en esta primera fase se reflejan en la tabla II - F1.

Tabla II - F1: Características generales de la cohorte de pacientes que compara la técnica convencional con la técnica OSNA en el estudio intraoperatorio del GC.

Características	No. de pacientes		TOTAL	p
	H&E (n=303)	OSNA (n=306)		
Edad, mediana (rango)	60,7 (29-95)	61 (28-90)	60,8 (28-95)	0,86*
Tamaño tumoral en AP				
Media (rango) mm.	17 (2-80)	17 (9-90)	17,1 (2-90)	0,23*
Tipo Histológico, n (%)				
Ductal	252 (83,2)	258 (84,1)	510 (83,7)	
Lobulillar	30 (9,9)	30 (9,8)	60 (9,9)	0,86 ^a
Otros	21 (6,3)	18 (5,9)	39 (6,4)	
Multifocal, n (%)				
Presente	34 (11,2)	46 (15)	80 (13,1)	0,16 ^a
Ausente	269 (88,8)	260 (85)	529 (86,9)	
Grado Histológico, n (%)				
Grade 1	68 (23)	75 (25,2)	143 (24,2)	
Grade 2	154 (52,2)	138 (46,5)	292 (49,3)	0,37 ^a
Grade 3	73 (24,8)	84 (28,3)	157 (26,5)	
Desconocido	8	9		
Receptor de Estrógenos, n (%)				
Positivo	272 (89,8)	273 (89,2)	545 (89,5)	0,89 ^a
Negativo	31 (10,2)	33 (10,8)	64 (10,5)	
Receptor de Progesterona, n (%)				
Positivo	242 (78,9)	239 (78,1)	481 (79)	0,24 ^a
Negativo	61 (20,1)	67 (21,9)	128 (21)	
Her2/neu, n (%)				
Positivo	26 (8,7)	27 (8,8)	53 (8,8)	
Negativo	274 (91,3)	279 (91,2)	553 (91,2)	0,94 ^a
Desconocido	3	0		
Invasión Linfovascular, n (%)				
Presente	30 (10)	46 (15,1)	76 (12,6)	
Ausente	270 (90)	259 (84,9)	529 (87,4)	0,06 ^a
Desconocido	3	1		
Ki 67, n (%)				
> 15%	78 (26,4)	101 (33,1)	179 (29,8)	
≤ 15%	217 (73,6)	204 (66,9)	421 (70,2)	0,07 ^a
Desconocido	8	1		

*p obtenida mediante el test de U de Mann-Whitney.

^ap obtenida mediante el test de Chi-Cuadrado.

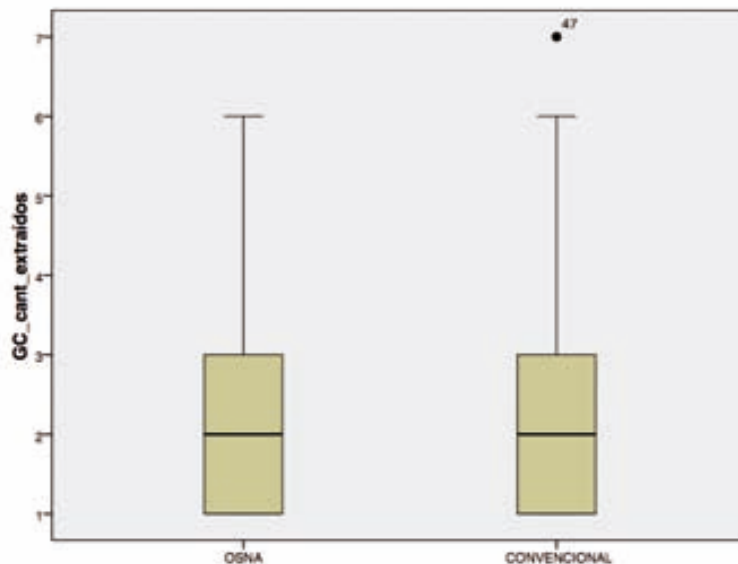
En general, ambos grupos de estudio no mostraron diferencias al analizar el tipo histológico de los tumores, el grado histológico, la presencia o no de tumores multifocales, la presencia de receptores hormonales positivos, o la sobreexpresión de Her2/neu. La invasión linfovascular y el porcentaje del Ki67 no presentaron

diferencias estadísticamente significativas. En la población estudiada el 83,7% de los tumores eran carcinoma ductal infiltrante, el 13% eran multifocales, el 75,8% presentaban grados histológicos 2 ó 3, el 89,5% presentaban receptores de estrógenos positivos y el 79% receptores de progesterona positivos, el 8,8% tenía sobreexpresión de Her2/neu, el 70,2% de los tumores un $Ki67 \leq 15\%$ y el 87,4% de los mismos no presentaban invasión linfovascular.

4.1.2 Estado de los ganglios centinela

Durante la primera fase se analizaron 1217 ganglios centinela de las 609 pacientes incluidas en el estudio. Seiscientos uno ganglios centinela (49,4%) fueron analizados mediante la técnica convencional con una media de 1,9 ganglios (rango, 1 - 6), mientras que 616 (50,6%) ganglios centinela, con una media de 2 ganglios (rango, 1 - 7), se examinaron mediante la técnica OSNA. Esta diferencia no fue estadísticamente significativa, $p=0,15$ (gráfico I - F1).

Gráfico I - F1: Box plot de la cantidad de ganglios centinela extraídos en la cohorte de casos (OSNA) y la cohorte control (CONVENCIONAL).



En la tabla III - F1 se detallan las características de los ganglios centinela en relación a la técnica empleada para su estudio intraoperatorio. La cantidad de ganglios centinela resecados no mostró diferencias estadísticamente significativas, teniendo en cuenta que en 76 pacientes (25%) en el grupo estudiado mediante la técnica convencional y en 83 pacientes (el 27%) en el estudiado con la técnica OSNA se resecaron tres o más GC.

Al comparar la frecuencia de detección de ganglios centinela positivos o negativos no hubo diferencias entre ambas técnicas de estudio. En total, en las pacientes estudiadas mediante la técnica convencional que presentaron GC metastásicos, se resecaron 161 GCs, de los cuales 100 (el 62%) fueron positivos. Por otro lado, en las pacientes estudiadas mediante la técnica OSNA que presentaron GC positivo, se resecaron 240 GCs de los cuales 142(59%) fueron positivos. Esta diferencia no demostró significación estadística.

Tabla III - F1: Características de los ganglios centinela de la cohorte de pacientes que compara la técnica convencional con la técnica OSNA.

Características	No. de pacientes		p
	H&E (n=303)	OSNA (n=306)	
Total GC resecados, n.			
Media (rango).	1,9 (1 - 6)	2 (1 - 7)	0,15*
GC resecados, n (%)			
1	112 (37)	119 (39)	
2	115 (38)	104 (34)	0,59*
≥ 3	76 (25)	83 (27)	
GC positivos, n (%)			
0	223 (73,6)	198 (64,7)	
1	62 (77,5)	80 (74,1)	
2	16 (20)	24 (22,2)	0,11*
≥ 3	2 (2,5)	4 (3,7)	
Tipo de metástasis del GC, n (%)			
Micrometástasis	33 (41,2)	47 (43,5)	0,17*
Macrometástasis	47 (58,8)	61 (56,5)	

*p obtenida mediante el test de Chi-Cuadrado.

Sesenta y dos pacientes (77,5%) en el grupo convencional y 80 pacientes (74,1%) en el grupo OSNA tenían un solo GC positivo. Dos pacientes (2,5%) en el grupo convencional y cuatro pacientes (3,7%) en el grupo estudiado mediante OSNA presentaron tres o más GC positivos, diferencias sin significación estadística

($p=0,11$). Más de la mitad de los GC positivos presentaban macrometástasis, en el 58,8% de las pacientes en el estudio convencional y en el 56,5% de las mismas en el grupo OSNA ($p=0,17$).

4.1.3 Momento de la realización de linfadenectomía axilar complementaria

Cuando el resultado intraoperatorio del ganglio centinela fue positivo la LA complementaria se realizó en el mismo acto operatorio. En los casos con resultado intraoperatorio negativo del GC pero que en el estudio definitivo se evidenció afectación metastásica del mismo, la linfadenectomía complementaria se realizó en una segunda intervención. Sin embargo, hubo tres pacientes en cada grupo (representando el 2,7% en el estudio convencional y el 3,7% en el grupo OSNA) en las que no se realizó la LA complementaria por decisión de las pacientes o del comité multidisciplinario después de la discusión postoperatoria del resultado de anatomía patológica definitivo.

En el grupo de estudio convencional del ganglio centinela la LA complementaria se realizó en el mismo acto operatorio en 50 pacientes (64,9%). En 42 pacientes (84%) debido a macrometástasis, mientras que en 8 pacientes (16%) por micrometástasis en el estudio intraoperatorio del ganglio centinela, mostrando una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,001$). En este mismo grupo, en 27 pacientes (35,1%) la LA complementaria se realizó en una segunda intervención debido al resultado positivo del estudio diferido del ganglio centinela. En 22 pacientes (81,5%) por micrometástasis en el estudio definitivo del ganglio centinela y en 5 pacientes (18,5%) por macrometástasis en el estudio definitivo del ganglio centinela, con diferencias estadísticamente significativas ($p=0,001$).

En el grupo de estudio del ganglio centinela mediante la técnica OSNA todas las LA se realizaron durante el mismo acto operatorio ($p=0,001$), en 47 pacientes (43,5%) por micrometástasis y en 61 pacientes (56,5%) por macrometástasis.

4.1.4 Análisis de la discordancia del estudio intraoperatorio y diferido de la técnica convencional

El estudio intraoperatorio del ganglio centinela mediante la técnica convencional evidenció una tasa de falsos negativos del 11,8%. El estudio diferido de los ganglios centinelas mostró que 30 pacientes, en las cuales el ganglio centinela fue negativo en el estudio intraoperatorio, presentaban metástasis en el estudio diferido, 25 pacientes (83,3%) con micrometástasis y 5 pacientes (16,7%) con macrometástasis (tabla IV - F1).

Tabla IV - F1: Análisis de discordancia en la cohorte de pacientes de técnica convencional según resultado intraoperatorio y diferido del ganglio centinela.

n (%)	AP del ganglio centinela definitiva			p
	Negativo	Micrometástasis	Macrometástasis	
AP del ganglio centinela intraoperatoria				
Negativo	223 (100)	25 (75,8)	5 (10,6)	
Micrometástasis	0	8 (24,2)	0	0,001*
Macrometástasis	0	0	42 (89,4)	
	223	33	47	

*p obtenida mediante el test de U de Mann–Whitney.

En 12 pacientes se encontraron células tumorales aisladas mediante técnicas de IHQ en el estudio diferido de ganglios centinela que fueron diagnosticados como negativos en el estudio intraoperatorio y que no se han incluido en el análisis.

Por lo tanto, del total de macrometástasis diagnosticadas en el grupo de pacientes cuyos ganglios centinela fueron evaluados mediante la técnica convencional, 42 pacientes (89,4%) se detectaron por el estudio intraoperatorio, mientras que en 5 pacientes (10,6%) se detectaron en el estudio diferido. Por otro lado, del total de micrometástasis diagnosticadas en este grupo de pacientes, solo en 8 pacientes (24,2%) se encontraron en el estudio intraoperatorio, mientras que en 25 pacientes (75,8%) se diagnosticaron en el estudio diferido del ganglio centinela. Esta diferencia fue estadísticamente significativa (p=0,001).

4.1.5 Estado de los ganglios en la linfadenectomía complementaria

Se encontraron en la LA complementaria una media de 15,5 ganglios linfáticos (rango, 6 - 37) en el grupo de técnica convencional y de 15 ganglios linfáticos (rango, 6 - 33) en el grupo de técnica OSNA ($p=0,37$) (tabla V - F1).

Tabla V - F1: Características de las linfadenectomías complementarias de la cohorte de pacientes que compara la técnica convencional con la técnica OSNA.

Características	No. de pacientes		p
	H&E (n=77)	OSNA (n=105)	
Total GnoC resecaados, n.			
Media (rango).	15,5 (6 - 37)	15 (6 -33)	0,37*
GnoC positivos, n (%).			
0	60	75	
1	7 (41,2)	15 (50)	
2	2 (11,8)	5 (16,7)	0,74 ^a
3	3 (17,6)	4 (13,3)	
4-9	2 (11,8)	4 (13,3)	
≥ 10	3 (17,6)	2 (6,7)	

*p obtenida mediante el test de U de Mann–Whitney.

^ap obtenida mediante el test de Chi-Cuadrado.

En el grupo de estudio convencional, 60 pacientes (78%) presentaban como único ganglio metastásico axilar el ganglio centinela, siendo el resto de los ganglios no centinela identificados en la linfadenectomía negativos. En el grupo de estudio mediante OSNA, 75 pacientes (71,4%) tenían el GC como el único ganglio positivo. En ambos grupos el mayor porcentaje de pacientes tenían sólo un ganglio no centinela positivo en la LA ($p=0,74$).

4.1.6 Estado de los ganglios axilares según el TNM

La distribución de las metástasis axilares de la cohorte analizada demostró que en el grupo de estudio intraoperatorio del ganglio centinela mediante la técnica convencional, 223 pacientes (73,6%) presentaron pN0(sn); mientras que en el grupo de estudio mediante la técnica OSNA 198 pacientes (64,7%) fueron

pN0(sn). En cuanto a la frecuencia de pNmi, en el grupo convencional fue del 9,2% (28 pacientes) y en el grupo de la técnica OSNA del 12,7% (39 pacientes). Esta diferencia no demostró significación estadística ($p= 0,99$) (tabla VI - F1).

El resto de la distribución de las metástasis axilares según el estadio patológico del TNM se detalla en la tabla siguiente y, como se observa, sin diferencias significativas en ambos grupos

Tabla VI - F1: Características del estatus ganglionar de la cohorte de pacientes que compara la técnica convencional con la técnica OSNA.

Características	No. de pacientes		p
	H&E (n=303)	OSNA (n=306)	
Estadio pN, AJCC, n (%).			
pN0(sn)	223	198	
pN1mi	28 (9,2)	39 (12,7)	
pN1a	40 (13,2)	55 (18)	0,99 ^a
pN2a	6 (2)	8 (2,6)	
pN3a	3 (1)	3 (1)	
pN1(sn) #	3 (1)	3 (1)	

representa las pacientes con GC positivo sin linfadenectomía.
^ap obtenida mediante el test de Chi-Cuadrado.

4.1.7 Distribución de los subtipos moleculares

El agrupamiento de los **subtipos moleculares** intrínsecos en la población total mostró que en ambos grupos la mayor parte de los tumores se clasifican como Luminal A, mientras que < 10% de los tumores en ambos grupos pertenecen a los subtipos de sobreexpresión Her2 y a los triple negativos. Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p=0,44$).

El análisis por grupos de estudio según presentaban o no metástasis en los ganglios centinela tampoco evidenció diferencias estadísticamente significativas, así como si el análisis se realiza según el tipo de metástasis en los diferentes subtipos moleculares intrínsecos (tabla VII - F1).

Tabla VII - F1: Subtipos moleculares de la cohorte de pacientes que compara la técnica convencional con la técnica OSNA en el estudio intraoperatorio del GC.

n (%)	No. de pacientes		TOTAL	p
	H&E (n=303)	OSNA (n=306)		
Subtipos moleculares				
LUMINAL A	202 (67,8)	191 (62,6)	393 (65,2)	
LUMINAL B	51 (17,1)	68 (22,3)	119 (19,7)	
TUMORES HER2	26 (8,7)	27 (8,9)	53 (8,8)	0,44 ^a
TRIPLE NEGATIVOS	19 (6,4)	19 (6,2)	38 (6,3)	
Desconocido	5	1		
GC negativos				
	218	197		
LUMINAL A	146 (67)	121 (61,4)		
LUMINAL B	41 (18,8)	40 (20,3)		0,64 ^a
TUMORES HER2	17 (7,8)	20 (10,1)		
TRIPLE NEGATIVOS	14 (6,4)	16 (8,1)		
GC positivos				
	80	108		
LUMINAL A				
Micrometástasis	26 (46,4)	33 (47,1)		0,92 ^a
Macrometástasis	30 (53,6)	37 (52,9)		
LUMINAL B				
Micrometástasis	2 (20)	10 (35,7)		0,45 ^a
Macrometástasis	8 (80)	18 (64,3)		
TUMORES HER2				
Micrometástasis	3 (33,3)	3 (42,9)		0,54 ^a
Macrometástasis	6 (66,7)	4 (57,1)		
TRIPLE NEGATIVOS				
Micrometástasis	2 (40)	1 (33,3)		0,71 ^a
Macrometástasis	3 (60)	2 (66,7)		

^ap obtenida mediante el test de Chi-Cuadrado.

Al evaluar la distribución en el grupo estudiado mediante la técnica convencional, 56 pacientes (27,7%) con tumores Luminal A, 10 pacientes (19,6%) con tumores Luminal B, 9 pacientes (34,6%) con tumores HER2, y 5 pacientes (26,3%) con tumores triple negativos tuvieron positivo el GC. En el grupo de la técnica OSNA, 70 pacientes (24%) con tumores Luminal A, 28 pacientes (41%) con tumores Luminal B, 7 pacientes (25%) con tumores HER2, y 3 pacientes (15%) con tumores triple negativos tuvieron metástasis en el GC, sin diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (tabla VII - F1).

4.2 RESULTADOS DE LA SEGUNDA FASE (F2)

4.2.1 Características generales de la población F2

En la segunda fase del estudio se evaluó una cohorte de 306 pacientes tratadas en forma consecutiva. La **edad media** de las pacientes fue de 62 años (rango, 28 – 90). En 90 pacientes (29,4%) la edad fue < 50 años, mientras que en 216 pacientes (70,6%) la edad al diagnóstico fue ≥ 50 años.

El **tamaño tumoral patológico** medio de la población fue de 17,1 mm (rango, 1 – 90). El tamaño tumoral demostró que una paciente (0,3%) presentaba pT1mi, 13 pacientes (4,2%) presentaban pT1a, 57 pacientes (18,6%) pT1b, 150 pacientes (49%) pT1c, 83 pacientes (27,1%) pT2 y dos pacientes (0,7%) pT3.

El estudio según el **tipo histológico** demostró que 258 pacientes (84,3%) tenían un carcinoma ductal infiltrante, 30 pacientes (10%) un carcinoma lobulillar infiltrante y 18 pacientes (5,9%) otros tipos histológicos. El **grado histológico** de los tumores mamarios se distribuyó de la siguiente forma: grado 1 en 75 pacientes (25,4%), grado 2 en 138 pacientes (46,5%) y grado 3 en 84 pacientes (28,3%).

El estudio de los **receptores hormonales** fue positivo en 275 pacientes, representando el 89,9% de la cohorte, mientras que fue negativo en 31 pacientes (10,1%). Los receptores estrogénicos fueron positivos en 273 pacientes (89,2%), y los de progesterona fueron positivos en 239 pacientes (78,1%). Veintisiete pacientes (8,8%) tenían **sobreexpresión del Her2/neu**, y en 279 pacientes (91,2%) no estaba sobre expresado.

4.2.2 Características de la población según el estatus del GC por OSNA

En 198 pacientes (64,7%) el resultado del estudio intraoperatorio del ganglio centinela mediante la técnica OSNA fue negativo, en tanto que en 108 pacientes (35,3%) el resultado fue positivo (OSNA + u OSNA ++).

La **edad media** de las pacientes en las que el resultado del ganglio centinela fue negativo fue de 63 años (rango, 32 – 90). La edad media de las pacientes en las que el resultado del GC fue positivo fue 61 años (rango, 28 - 89) ($p=0,16$) (tabla VIII - F2).

El **tamaño tumoral** entre el grupo de pacientes con GC negativo y GC positivo tuvo diferencias estadísticamente significativas, con una media de 15 y 18 mm, respectivamente ($p=0,001$). En cuanto al tamaño tumoral según el TNM, en ambos grupos de GC negativo y positivo la mayoría de pacientes 94 y 56 pacientes (47% y 52% respectivamente) tenían un tamaño patológico de tumor p T1c ($> 10\text{mm} - \leq 20\text{mm}$). De la misma forma, esta diferencia evidenció significación estadística, $p=0,001$ (Tabla VIII - F2).

El análisis según el **tipo histológico** demostró que en el grupo de ganglio centinela negativo, 168 pacientes (85%) presentaban carcinoma ductal infiltrante, 20 pacientes (10%) carcinoma lobulillar infiltrante y 10 pacientes (5%) otros tipos histológicos. En el grupo de ganglio centinela positivo, 90 pacientes (84%) presentaron carcinoma ductal infiltrante, 10 pacientes (9%) carcinoma lobulillar infiltrante y ocho pacientes (7%) otros tipos histológicos. Esta diferencia no mostró significación estadística ($p=0,69$).

El análisis según el **grado histológico** demostró que en ambos grupos de GC negativo y positivo aproximadamente el 50% de las pacientes tenían un grado II (47% y 46% respectivamente). Esta diferencia no mostró significación estadística ($p=0,86$).

El estudio de los receptores para estrógeno y progesterona, agrupados como **receptores hormonales**, no evidenció diferencias estadísticamente significativas ($p=0,05$), siendo estos positivos en 173 pacientes (87%) en el grupo de ganglio centinela negativo, y en 102 pacientes (94%) en el grupo de ganglio centinela positivo.

Tabla VIII - F2: Características de la cohorte de pacientes con estudio intraoperatorio del GC con la técnica OSNA según el resultado positivo o negativo del mismo.

Características	Ganglio centinela		p
	NEGATIVO (n=198)	POSITIVO (n=108)	
Edad, media (rango)	63 (32-90)	61 (28-89)	0,76*
< 50 años, n (%)	53 (27)	37 (34)	0,16 ^a
≥ 50 años, n (%)	145 (73)	71 (68)	
Tamaño tumoral en AP			
Media (rango) mm.	15 (1 - 50)	18 (3 - 80)	0,001*
Tamaño tumoral según AJCC, n (%)			
pT1mi	1 (1)	0	
pT1a	12 (6)	1 (1)	
pT1b	47 (24)	10 (9)	0,001 ^a
pT1c	94 (47)	56 (52)	
pT2	44 (22)	39 (36)	
pT3	0	2 (2)	
Tipo Histológico, n (%)			
Ductal	168 (85)	90 (84)	
Lobulillar	20 (10)	10 (9)	0,69 ^a
Otros	10 (5)	8 (7)	
Grado Histológico, n (%)			
Grade 1	47 (24)	28 (27)	
Grade 2	90 (47)	48 (46)	0,86 ^a
Grade 3	56 (29)	28 (27)	
Desconocido	5	4	
Receptor de Estrógeno, n (%)			
Positivo	173 (87)	100 (93)	0,29 ^a
Negativo	25 (13)	8 (7)	
Receptor de Progesterona, n (%)			
Positivo	145 (73)	94 (87)	0,03 ^a
Negativo	53 (27)	14 (13)	
Her2/neu, n (%)			
Positivo	20 (10)	7 (8)	0,28 ^a
Negativo	178 (90)	101 (94)	
Invasión Linfovascular, n (%)			
Ausente	173 (87)	86 (80)	
Presente	25 (13)	21 (19)	0,10 ^a
Desconocido	0	1 (1)	
Ki 67, n (%)			
> 15%	66 (33)	35 (32)	
≤ 15%	131 (67)	73 (68)	0,84 ^a

*p obtenida mediante el test de U de Mann-Whitney.

^ap obtenida mediante el test de Chi-Cuadrado.

Por otro lado, los receptores para estrógeno fueron positivos en 173 pacientes (87%) en el grupo con ganglio centinela negativo, y en 100 pacientes (93%) en el

grupo con ganglio centinela positivo ($p=0,29$); y los receptores para progesterona fueron positivos en 145 pacientes (73%) en el grupo con ganglio centinela negativo, y en 94 pacientes (87%) en el grupo con ganglio centinela positivo, diferencia esta última con significación estadística ($p=0,03$).

Veinte pacientes (10%) en el grupo de centinela negativo tenían un tumor que sobre expresaba el Her2 y en 7 pacientes (8%) con ganglio centinela positivo, sin evidenciar diferencias estadísticamente significativas, $p=0,28$.

En el grupo de GC negativo, 173 (87%) de pacientes no tenían **ILV** en el tumor y en el grupo de GC positivo 86 pacientes (80%) tampoco. Esta diferencia no mostró significación estadística, $p=0,10$.

Tampoco hubo diferencias significativas cuando analizamos el índice de proliferación celular **Ki67** ($p=0,84$). En ambos grupos, de GC negativo y positivo, las 2/3 de los pacientes tenían un $Ki67 \leq 15\%$.

El resto de las características de ambos grupos se detallan en la Tabla VIII - F2.

4.2.3 Análisis de los ganglios centinela según la técnica OSNA

Durante esta fase se analizaron 616 ganglios centinela mediante la técnica OSNA en 306 pacientes, con una media de 1.9 ganglios extraídos (rango, 1 - 5) en el grupo de pacientes con GC negativo, y de 2,22 ganglios centinela extraídos (rango, 1 - 7) en el grupo con GC positivo, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0,04$).

La distribución de la cantidad de GC resecados entre los dos grupos, GC negativo y positivo, es similar en ambos ($p=0,11$) (tabla IX - F2).

De las pacientes con GC positivo, 80 pacientes presentaban sólo un ganglio centinela positivo (74,1%), 24 pacientes (22,2%) dos ganglios centinela positivos y

4 pacientes (3,7%) tres o más GC positivos. De las pacientes con GC positivo, 47 (43,5%) presentaron micrometástasis (OSNA +), mientras que 61 pacientes (56,5%) presentaron macrometástasis (OSNA ++).

Tabla IX- F2: Características de los ganglios centinela de la cohorte de pacientes estudiada mediante la técnica OSNA.

Características	Ganglio centinela		p
	NEGATIVO (n=198)	POSITIVO (n=108)	
Total GC resecaados, n.			
Media (rango).	1,9 (1 - 5)	2,22 (1 - 7)	0,04*
GC resecaados, n (%)			
1	82 (41,4)	37 (34,3)	
2	70 (35,4)	34 (31,4)	0,11*
≥ 3	46 (23,2)	37 (34,3)	
GC positivos, n (%)			
1	0	80 (74,1)	
2	0	24 (22,2)	
≥ 3	0	4 (3,7)	
Tipo de metástasis del GC, n (%)			
Micrometástasis	0	47 (43,5)	
Macrometástasis	0	61 (56,5)	

*p obtenida mediante el test de Chi-Cuadrado.

4.2.4 Análisis de los GnoC de la linfadenectomía axilar

De las 108 pacientes en las cuales el ganglio centinela fue metastásico en el estudio mediante la técnica OSNA en 105 (97%) se realizó una LA complementaria. En tres pacientes (2,8%) no se realizó la LA por la comorbilidad asociada: una paciente tenía macrometástasis en el GC y otras dos pacientes tenían micrometástasis en el GC. En las linfadenectomías complementarias se encontraron una media de 14 ganglios no centinela (rango, 6 – 33).

Al analizar la cantidad de ganglios no centinela afectados en la LA complementaria, 75 pacientes (71,4%) no presentaban más ganglios metastásicos, mientras que 30 pacientes (28,6%) presentaba otro u otros ganglios no centinela afectados. Dentro de estas últimas, 15 pacientes (50%) presentaban solo un ganglio no centinela afecto; 5 pacientes (16,7%) presentaban dos ganglios no centinela afectados; 4 pacientes (13,3%) tres ganglios no centinela comprometidos; 4

pacientes (13,3%) entre cuatro a nueve ganglios no centinela afectados; y dos pacientes (6,7%) diez o más ganglios no centinela metastásicos.

Según la clasificación actual del TNM, teniendo en cuenta la totalidad de los ganglios analizados en cada paciente, tanto centinelas como no centinelas, la distribución de los mismos se detalla en la tabla X - F2.

Tabla X - F2: Características del estatus ganglionar de la cohorte de pacientes estudiada con la técnica OSNA.

Características	No. de pacientes
	OSNA (n=306)
Estadio N, AJCC, n (%).	
pN0(sn)	198
pN1mi	39 (36,1)
pN1a	55 (50,9)
pN2a	8 (7,4)
pN3a	3 (2,8)
pN1(sn) #	3 (2,8)

representa las pacientes con GC positivo sin linfadenectomía.

^ap obtenida mediante el test de Chi-Cuadrado.

4.2.5 Características de la población según estatus de los GnoC en la linfadenectomía axilar

La **edad media** del grupo de pacientes con GnoC negativos en la linfadenectomía complementaria después de un GC positivo fue de 57 años (rango, 28 – 87). En el grupo de GnoC positivos, la edad media fue 67 años (rango, 36 – 84). La edad no demostró diferencias estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p=0,10$) (tabla XI - F2).

El **tamaño tumoral** medio evaluado en el estudio final de anatomía patológica, fue de 17 mm (rango, 3 – 42) en el grupo de pacientes con GnoC negativo y de 20 mm (rango, 9 - 80) en el grupo de pacientes con GnoC positivos. Aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa, se observa una tendencia hacia la significación estadística ($p=0,05$), esto debido probablemente al tamaño de la muestra.

En cuanto al tamaño tumoral según el TNM, en ambos grupos de GnoC negativo y GnoC positivo, la mitad de los pacientes (52% y 50%, respectivamente) tenían un tamaño tumoral patológico pT1c ($> 10\text{mm} - \leq 20\text{mm}$). Esta diferencia no mostró significación estadística ($p=0,12$).

La mayor parte de los carcinomas fueron ductales infiltrantes en ambos grupos. En el grupo de pacientes que tenía a los ganglios centinela como único foco de metástasis, es decir, el grupo GnoC negativo, se diagnosticó un carcinoma ductal infiltrante en 62 pacientes (83%), mientras que en el grupo con GnoC positivos en 26 pacientes (87%) se diagnosticó carcinoma ductal infiltrante ($p=0,68$).

No se evidenció diferencias estadísticamente significativas con respecto al **grado histológico** de los tumores mamarios entre ambos grupos ($p=0,23$). En ambos grupos GnoC negativo y GnoC positivo el 48% y el 43% respectivamente se clasificó como grado II.

El estudio de los **receptores hormonales** demostró diferencias estadísticamente significativas ($p=0,002$). En el grupo GnoC negativo, 74 pacientes (99%) eran receptores hormonales positivos, mientras que en el grupo GnoC positivo esta proporción bajó al 83% siendo receptores hormonales negativos 5 pacientes (17%) (tabla XI - F2).

La **sobreexpresión del Her2/neu** en la cohorte con GnoC negativos estaba presente en 4 pacientes (5%) y ausente en 71 pacientes (95%); a diferencia que en la cohorte GnoC positivos donde 3 pacientes (10%) presentaban tumores con sobreexpresión de Her2/neu y en 27 pacientes (90%) no estaba sobre expresado ($p=0,38$).

No hubo diferencias significativas entre los grupos en relación a la ILV ($p= 0,81$).

En cuanto al índice de proliferación celular **Ki67**, en el grupo de GnoC negativo 21 pacientes (28%) presentaba el Ki67 $> 15\%$, mientras que en 54 pacientes (72%) fue $\leq 15\%$; en tanto que, en las pacientes con GnoC positivos en 14

pacientes (47%) el Ki67 fue > 15% y en 16 pacientes (53%) fue ≤ 15%. Esta diferencia fue no estadísticamente significativa (p=0,06) (tabla XI - F2).

Tabla XI - F2: Características de los ganglios no centinela según fueran negativos o positivos de las linfadenectomías realizadas después de GC positivo mediante la técnica OSNA.

Características	GnoC en la ALND		p
	NEGATIVOS (n=75)	POSITIVOS (n=30)	
Edad , media (rango)	57 (28-87)	67 (36-84)	0,10*
< 50 años, n(%)	30 (40)	7 (23)	0,10 ^a
≥ 50 años, n (%)	45 (60)	23 (77)	
Tamaño tumoral en AP			
Media (rango) mm.	17 (3 - 42)	20 (9 - 80)	0,05*
Tamaño tumoral según AJCC, n (%)			
pT1mi	0	0	
pT1a	1 (1)	0	
pT1b	9 (12)	1 (3)	0,12 ^a
pT1c	39 (52)	15 (50)	
pT2	26 (35)	12 (40)	
pT3	0	2 (7)	
Tipo Histológico, n (%)			
Ductal	62 (83)	26 (87)	
Lobulillar	7 (9)	3 (10)	0,68 ^a
Otros	6 (8)	1 (3)	
Grado Histológico, n (%)			
1	21 (29)	5 (18)	
2	35 (48)	12 (43)	0,23 ^a
3	17 (23)	11 (39)	
Receptores Hormonales, n (%)			
Positivo	74 (99)	25 (83)	0,002 ^a
Negativo	1 (1)	5 (17)	
Her2/neu, n (%)			
Negativo	71 (95)	27 (90)	0,38 ^a
Positivo	4 (5)	3 (10)	
Invasión Linfovascular, n (%)			
Ausente	59 (79)	24 (80)	
Presente	15 (20)	6 (20)	0,81 ^a
Desconocido	1 (1)	0	
Ki 67, n (%)			
> 15%	21 (28)	14 (47)	0,06 ^a
≤ 15%	54 (72)	16 (53)	

*p obtenida mediante el test de U de Mann–Whitney.

^ap obtenida mediante el test de chi-cuadrado.

4.2.6 Análisis de las características de los ganglios centinela según el estatus de los GnoC en la linfadenectomía axilar

En el grupo de pacientes con ganglio centinela metastásico como único foco de la enfermedad axilar, 37 pacientes (49%) tuvieron micrometástasis (OSNA +) en el ganglio centinela y 38 pacientes (51%) tuvieron macrometástasis (OSNA ++) en los ganglios centinela estudiados mediante la técnica OSNA. Dentro de este mismo grupo de pacientes, 61 pacientes (81%) tuvieron un solo ganglio centinela positivo y 14 pacientes (19%) tenían dos ganglios centinela positivos.

Por otro lado, de las pacientes con otros ganglios no centinela afectados en la linfadenectomía complementaria, ocho (el 26%) tuvieron micrometástasis (OSNA +) en el ganglio centinela y 22 pacientes (73%) macrometástasis (OSNA ++) en los ganglios centinela estudiados, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0,03$). Dentro este último grupo de pacientes, 17 (el 57%) presentaban un único ganglio centinela afecto, 9 pacientes (30%) dos ganglios centinela afectados, y 4 pacientes (13%) tres o más ganglios centinela positivos en la evaluación intraoperatoria mediante la técnica OSNA, diferencia estadísticamente significativa, $p=0,001$ (tabla XII - F2).

El análisis de la **carga tumoral total** de los ganglios centinela afectados evidenció una diferencia estadísticamente significativa en cuanto a la presencia o no de otros ganglios no centinela metastásicos en la linfadenectomía complementaria. La carga tumoral total media de las pacientes con metástasis exclusiva en los ganglios centinela fue de $5,2 \times 10^3$ copias/ μL (rango, $2,8 \times 10^2 - 2,5 \times 10^7$), siendo de $5,6 \times 10^4$ copias/ μL (rango, $2,6 \times 10^2 - 1,2 \times 10^7$) en las pacientes con otros ganglios no centinela afectados ($p=0,006$).

Como se observa en la siguiente tabla el número de pacientes total es de 105 ya que de los 108 hay tres pacientes a los que no se hace una LA por lo que se eliminan en el estudio de los GnoC.

Tabla XII - F2: Características de los ganglios centinela afectados según el estado de los ganglios no centinela de las linfadenectomías complementarias.

Características	GnoC en la ALND		p
	NEGATIVOS (n=75)	POSITIVOS (n=30)	
Tipo de metástasis en el GC, n (%)			
Micrometástasis	37 (49)	8 (26)	0,03 ^a
Macrometástasis	38 (51)	22 (73)	
Cantidad de GC positivos, n (%)			
1	61 (81)	17 (57)	
2	14 (19)	9 (30)	0,001 ^a
≥ 3	0	4 (13)	
TTL en los GC, copias/μL			
Media (rango)	5,2x10 ³ (2,8x10 ² – 2,5x10 ⁷)	5,6x10 ⁴ (2,6x10 ² – 1,2x10 ⁷)	0,006*

*p obtenida mediante el test de U de Mann–Whitney.

^ap obtenida mediante el test de chi-cuadrado.

4.2.7 Análisis de regresión logística de la afectación de los GnoC en la linfadenectomía

Para el estudio de la influencia de las diferentes variables en las metástasis en ganglios no centinela en pacientes con GC positivo obtenido mediante la técnica OSNA se utilizó un análisis de regresión logística. Las variables seleccionadas para el mismo fueron la edad de las pacientes al momento del diagnóstico (< 50 años y ≥ 50 años), el tamaño tumoral, el tipo histológico, el grado histológico, la presencia de receptores hormonales, la sobreexpresión de Her2/neu, el estado del Ki67 (< 15% y ≥ 15%), ILV, el tipo de metástasis en el GC (macrometástasis ó micrometástasis), la cantidad de ganglios centinela positivos y la carga tumoral total mediante su conversión del log¹⁰.

4.2.7.1 Estudio univariado

En el análisis univariado la edad, el tipo y grado histológico, la sobreexpresión de Her2/neu, el Ki67, la invasión linfovascular y la cantidad de ganglios centinela

afectos no demostró diferencias estadísticamente significativas (tabla XIII - F2) (gráfico II - F2).

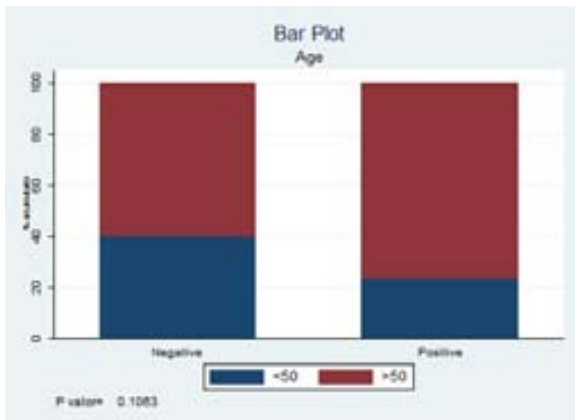
Tabla XIII - F2: Estudio univariado en relación de la presencia de GnoC positivos en la LA después de GC positivos por OSNA

	Odd Ratio (95%CI) Univariado	<i>p</i> Univariado
Edad		
< 50	1	
≥ 50	2,19 (0,84 – 5,74)	0,11
Tamaño tumoral		
	1,05 (1,00; 1,09)	0,03
Tipo histológico		
Ductal infiltrante	1	
Lobulillar infiltrante	1,02 (0,25 – 4,26)	0,70
Otros	0,40 (0,05 – 3,47)	
Grado histológico		
1	1	
2	1,44 (0,44 – 4,66)	0,24
3	2,72 (0,79 – 9,35)	
Receptores Hormonales		
Negativo	1	
Positivo	0,06 (0,01 – 0,61)	0,01
Her2/neu		
Negativo	1	
Positivo	1,97 (0,41 – 9,40)	0,39
Ki67		
≤ 15 %	1	
> 15 %	2,25 (0,94 – 5,41)	0,07
Invasión Linfovascular		
Ausente	1	
Presente	0,98 (0,34 – 2,84)	0,97
Tipo de metástasis del GC		
Micrometástasis	1	
Macrometástasis	2,68 (1,06 - 6,77)	0,03
Cantidad de GC positivos		
1	1	
2	2,31 (0,85 – 6,24)	0,09
TTL del GC*	1,67 (1,18 – 2,35)	0,003

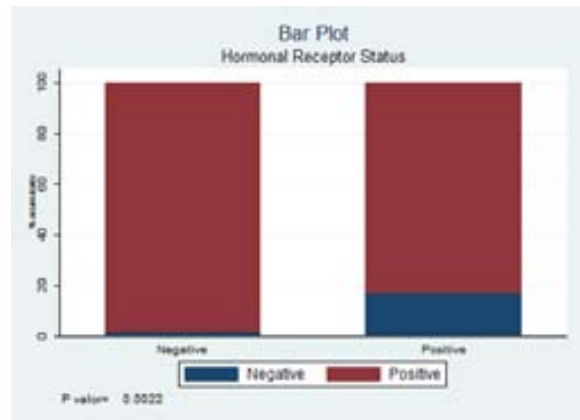
* TTL del GC es la carga total tumoral de los ganglios centinela positivos.

El tamaño tumoral en el análisis univariado evidenció un OR 1,05 (IC 95%: 1,00-1,09) con una significación estadística significativa (p=0,03). De la misma forma, los receptores hormonales también demostraron diferencias estadísticamente significativas con un OR de 0,06 (IC 95%: 0,01- 0,61) (p=0,01) (tabla XIII - F2).

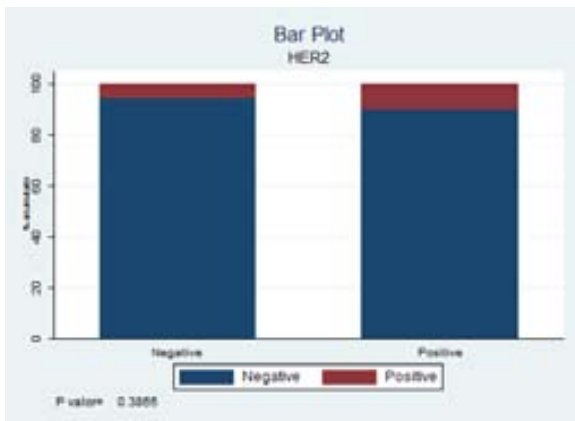
Gráfico II - F2: Diagrama de barras (Bar-Plot) del estudio de regresión logística en relación de la presencia de GnoC positivos en la LA complementaria después de GC positivos por la técnica OSNA.



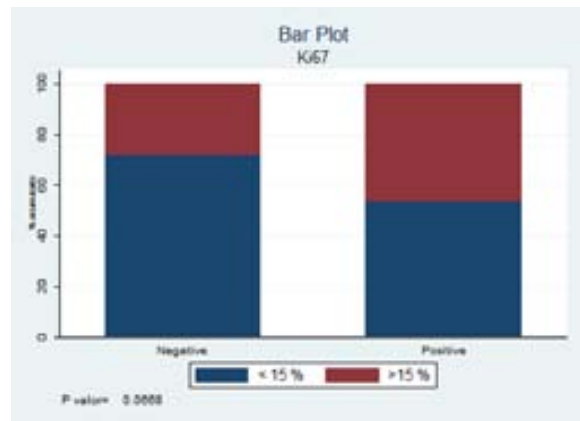
A: edad menor o mayor de 50 años según resultado de la LA.



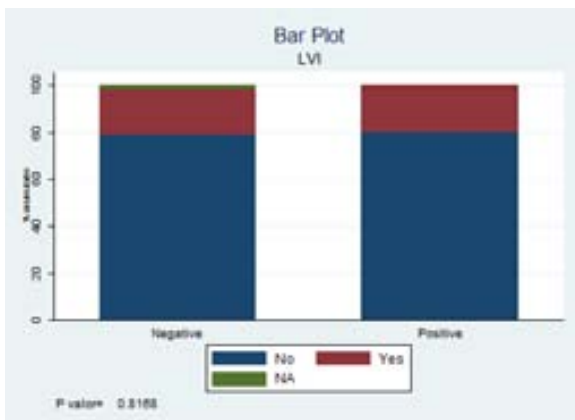
B: estatus de receptores hormonales según resultado de la LA.



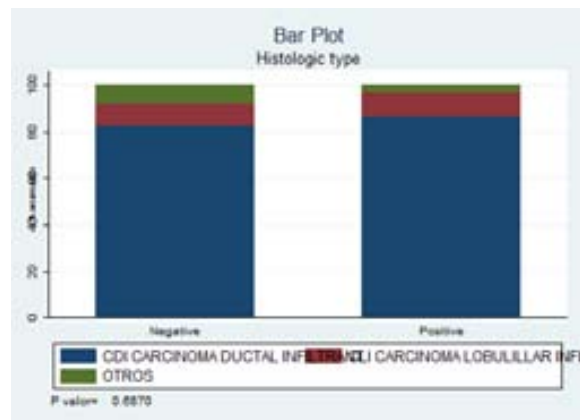
C: Her2 según resultado de la LA.



D: Ki67 según resultado de la LA.



E: ILV según resultado de la LA.

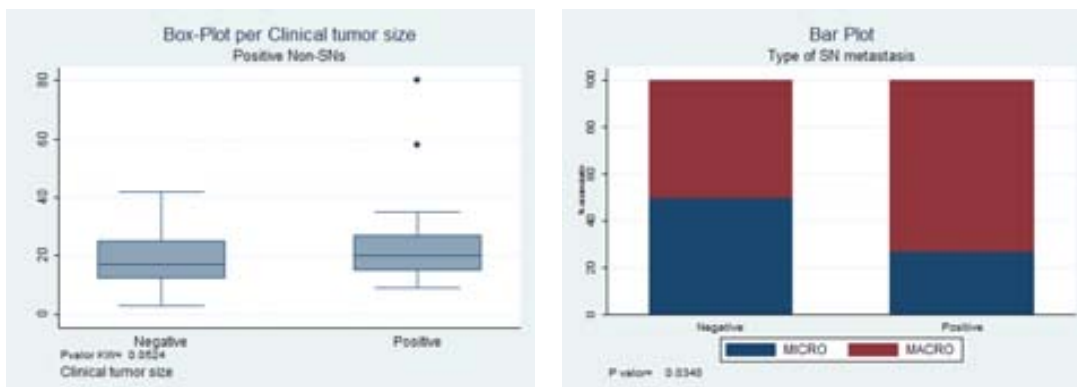


F: tipo histológico según resultado de la LA.

El tipo de metástasis del ganglio centinela mostró una diferencia estadísticamente significativa con un OR de 2,68 (IC 95%: 1,06 – 6,77), según fuera micrometástasis (OSNA +) ó macrometástasis (OSNA ++)
(p=0,03).

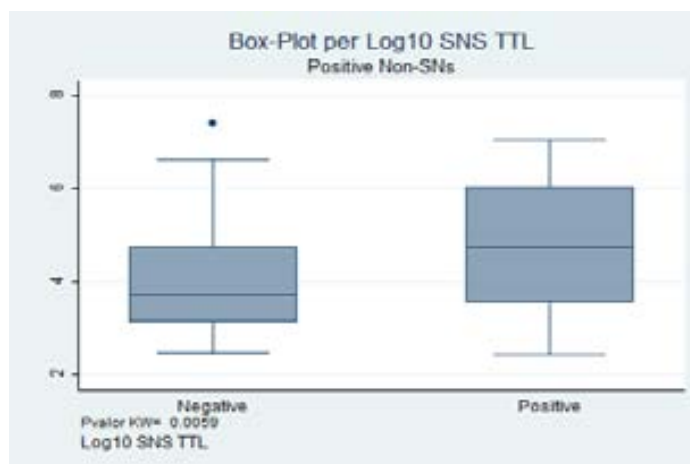
Por último, la TTL se relacionó con la predicción de las metástasis en GnoC en la linfadenectomía complementaria con un OR de 1,67 (IC 95%: 1,18 – 2,35), diferencia estadísticamente significativa, $p=0,003$ (gráfico III - F2).

Gráfico III - F2: Diagrama de barras (Bar-Plot) y de cajas (Box-Plot) del estudio de regresión logística del tipo metástasis y la TTL en relación de la presencia de GnoC positivos en la LA complementaria después de GC positivos por OSNA.



A: tamaño tumoral según resultado de la LA.

B: tipo de metástasis en el GC según resultado de la LA.



C: Log¹⁰ de la TTL según resultado de la LA.

4.2.7.2 Estudio multivariado

El análisis multivariado fue realizado con las variables que en el estudio univariado presentaron significación estadística. Incluyó el tamaño tumoral, los receptores hormonales, el tipo de metástasis del GC evaluado por la técnica OSNA y la TTL de los ganglios centinela afectados por OSNA (tabla XIV - F2).

El tamaño tumoral no mostró diferencias estadísticamente significativas en el estudio multivariado con un OR de 1,54 (IC 95%: 0,63 – 3,78) ($p=0,34$). Por otro lado los receptores hormonales mostraron un OR de 0,06 (IC 95%: 0,01 – 0,60) con una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,01$).

La presencia de macrometástasis en el GC (OSNA++) mostró en el análisis multivariado un OR de 1,93 (IC 95%: 1,08 – 3,43) con significación estadística significativa ($p=0,025$). Sin embargo cuando el ganglio centinela estaba afecto por micrometástasis (OSNA+) el OR fue 0,63 (IC 95%: 0,08 – 4,52) con una diferencia no estadísticamente significativa ($p=0,65$).

Tabla XIV - F2: Estudio multivariado en relación de la presencia de GnoC positivos en la LA después de GC positivo por OSNA.

	Odd Ratio (95%CI) Multivariado	p (todas las variables) Multivariado
Tamaño tumoral	1,54 (0,63 – 3,78)	0,34
Receptores Hormonales		
Negativo	1	
Positivo	0,06 (0,01 – 0,60)	0,01
Tipo de metástasis del GC		
Micrometástasis	0,63 (0,08 – 4,52)	0,65
Macrometástasis	1,93 (1,08 – 3,43)	0,025
TTL del GC*	1,69 (1,19 – 2,41)	0,003

* TTL del GC es la carga total tumoral de los ganglios centinela positivos.

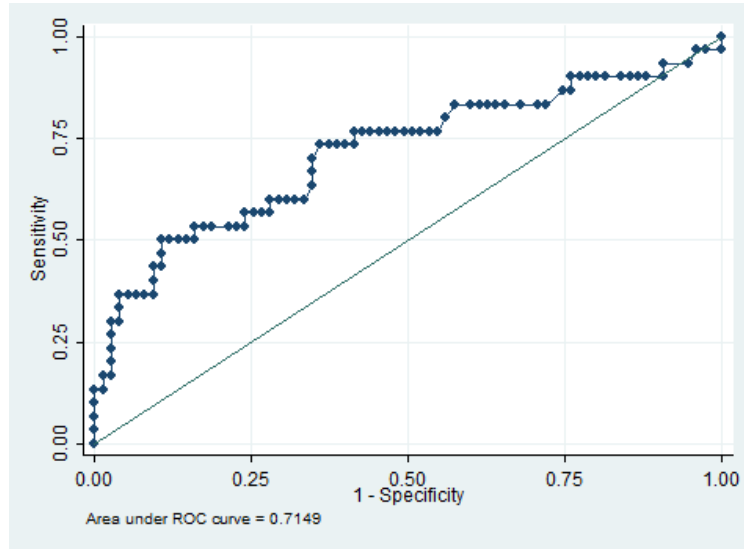
La carga tumoral total de los GC positivos evidenció una OR de 1,69 (IC 95%: 1,19 – 2,41) con una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,003$), mostrando que la misma actúa como variable independiente predictora de otros GnoC metastásicos en la linfadenectomía y sólo influenciada por el estado de los receptores hormonales.

4.2.8 Determinación del punto de corte de la carga tumoral total

A partir de estos resultados se realizó la curva ROC, representación gráfica de la sensibilidad frente a (1 – especificidad), y se calculó el área bajo la curva ROC

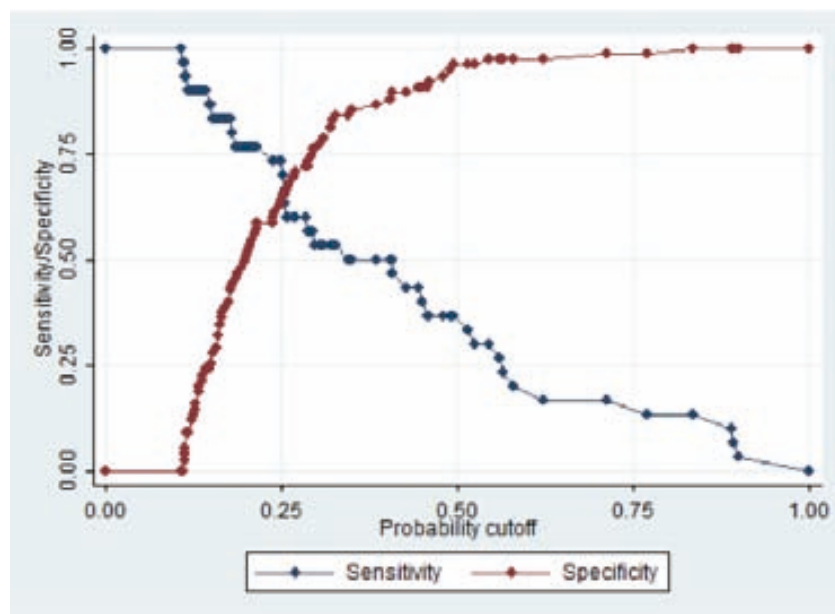
con la intención de evaluar la discriminación diagnóstica de la TTL (gráfico IV - F2). El área bajo la curva ROC de la TTL fue de 0,7149 (95% IC, 0,59 – 0,83).

Gráfico IV - F2: Área bajo la curva ROC de la carga tumoral total.



El gráfico V - F2 muestra la evolución de la probabilidad de que los pacientes incluidos (P +) tengan GnoC afectos según la sensibilidad y especificidad de los

Gráfico V - F2: Probabilidad de que los pacientes incluidos tengan ganglios no centinela afectos según la sensibilidad y especificidad de los valores de TTL.



valores de TTL. A partir de las tablas que generan esta figura (ver anexo 3 y 4) se eligió un punto de corte para la TTL a fin de reducir la probabilidad de presentar otros ganglios metastásicos en la axila (P +), aparte del GC, tanto como sea posible mientras se mantiene un valor de VPN aceptablemente alto. El punto de corte elegido de carga tumoral total fue 120.000 copias/ μL ($1,2 \times 10^5$), correspondiente a 5.08 del \log^{10} de la TTL que representa un valor predictivo negativo (VPN) de 80%, un valor predictivo positivo (VPP) de 56%, una sensibilidad del 46,7% y una especificidad de 85,5%.

Si evaluamos la población que presenta receptores hormonales positivos en función de la influencia de esta variable en el estudio multivariado, el punto de corte de carga tumoral total elegido es de 500.000 copias/ μL (5×10^5), correspondiente a 5,7 del \log^{10} de la TTL que representa un VPN de 83,7%, un VPP de 55,9%, una sensibilidad del 50% y una especificidad de 86,7%.

4.2.9 Repercusión del punto de corte de la carga tumoral total establecido

Evaluando el punto de cohorte establecido para la población total, 81 pacientes (77%) presentaron una TTL \leq de 120.000 copias/ μL ($1,2 \times 10^5$), de las cuales 64 pacientes (79%) no presentaron otros ganglios afectados en la linfadenectomía complementaria, mientras que 17 pacientes (21%) presentaron otros GnoC metastásicos en la linfadenectomía.

Por otro lado, 24 pacientes (23%) presentaron una TTL $>$ de 120.000 copias/ μL ($1,2 \times 10^5$), de las cuales 11 pacientes (45,8%) no presentaron otros ganglios afectados, mientras que 13 pacientes (54,2%) presentaron otros ganglios no centinela metastásicos en la linfadenectomía.

Al realizar el mismo análisis utilizando el punto de cohorte establecido de 500.000 copias/ μL (5×10^5) en la población con receptores hormonales positivos (99 pacientes), evidenciamos que 81 pacientes (82%) presentaron una TTL \leq de

500.000 copias/ μ L, de las cuales 66 pacientes (81,5%) no presentaron GnoC afectos en la linfadenectomía complementaria, mientras que 15 pacientes (18,5%) presentaron GnoC metastásicos en la linfadenectomía complementaria. De las 18 pacientes (18%) con TTL mayor de 500.000 copias/ μ L, 8 pacientes (44,4%) no presentaron otros GnoC afectos, mientras que 10 pacientes (55,6%) presentaron otros GnoC metastásicos en la linfadenectomía.

5. DISCUSIÓN

La técnica OSNA ha sido descrita como un procedimiento estandarizado para el estudio intraoperatorio del ganglio linfático en su totalidad, evitando así errores de muestreo. Los estudios de validación de la técnica OSNA publicados hasta la fecha son consistentes, y la describen como una herramienta confiable, reproducible, sencilla y de alta precisión para la evaluación intraoperatoria del estado del GC en pacientes con cáncer de mama.^[102, 107, 108] De hecho, diferentes instituciones han introducido la técnica OSNA en la práctica clínica diaria fuera de ensayos clínicos.^[97, 107, 108, 110] Su sensibilidad es comparable a la observada mediante el estudio por secciones múltiples convencional y significativamente más alta que la descrita mediante la impronta citológica,^[102, 107, 108] con una mayor sensibilidad para la detección de micrometástasis.^[107]

Los resultados de los diferentes estudios de validación de la técnica OSNA muestran una alta especificidad y sensibilidad en comparación con la histología convencional, como demuestra un reciente meta-análisis realizado con los artículos publicados hasta el momento donde se describe una especificidad del 0,98 (IC 95%: 0,96-1,00) y una sensibilidad del 0,87 (IC 95%: 0,81-0,93) con un valor predictivo negativo del 0,99.^[135] La tasa de falsos negativos se encuentra dentro del límite del 10% generalmente tolerada (8,3%).^[102] El tiempo que conlleva la reacción molecular de amplificación y los resultados semicuantitativos de CK19 obtenidos, que permiten la diferenciación de macrometástasis y micrometástasis, hacen de la técnica OSNA una herramienta adecuada para la evaluación intraoperatoria de GC.^[93, 96-98]

Los resultados de la primera fase de nuestro estudio demuestran que la técnica OSNA se compara favorablemente con la técnica convencional en cuanto a que no hay diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de pacientes con GC estudiados por técnicas convencionales o por OSNA. En nuestra serie hemos encontrado una tasa similar de micro y macrometástasis en el GC analizados por OSNA en comparación con la técnica convencional. De las metástasis detectadas mediante la técnica OSNA, el 56,5% eran macrometástasis y el 43,5% micrometástasis, en comparación con las detectadas mediante la técnica convencional donde el 58,8% eran macrometástasis y el 41,2% micrometástasis;

estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p=0,17$). Esto demuestra que los dos métodos tienen tasas de detección comparables. Este dato es importante pues permite la validación de la técnica OSNA para el estudio de los GC en cáncer de mama.

En nuestro estudio tampoco hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en la estadificación del cáncer de mama en función de las diferentes técnicas de estudio de los GC, así como no había diferencias en la distribución de los subtipos moleculares dependiendo de la técnica de estudio del GC realizada.

La introducción de la técnica OSNA en el estudio del GC ha ido surgiendo por la necesidad de homogenizar los resultados del estudio anatomopatológico del GC. Desde la descripción de la técnica del ganglio centinela en pacientes con cáncer de mama en 1993 ha sido difícil llegar a un consenso sobre la estandarización de la evaluación anatomopatológico del GC. Las controversias y discrepancias del estudio histológico del GC llevó en 2003 al European Working Group for Breast Screening Pathology a revisar los diferentes protocolos utilizados entre las instituciones europeas, encontrando múltiples diferencias entre ellas.^[78] Con lo cual, el examen histológico intraoperatorio convencional no está estandarizado, incluso es limitado en su capacidad para detectar metástasis debido a la evaluación parcial del ganglio. Y este es uno de los puntos que la técnica OSNA puede mejorar.

5.1 Estandarización del estudio anatomopatológico del ganglio centinela: primera ventaja de la técnica OSNA

El estudio molecular realiza la evaluación completa del ganglio en forma rápida, segura y reproducible otorgando un resultado semicuantitativo que a partir de un límite de cohorte preciso preestablecido permite la diferenciación de metástasis ganglionares de significado clínico.

Gracias a estas características la técnica OSNA permite que los resultados del estudio de los ganglios centinela sea comparable entre diferentes instituciones, mediante la distinción de los mismos como OSNA-negativos, OSNA-micrometástasis ú OSNA-macrometástasis; evitando así las diferencias interobservador que se generan con el estudio anatomopatológico convencional. Este beneficio es particularmente importante para la diferenciación de micrometástasis y macrometástasis de pequeño tamaño, dada la dificultad de su diagnóstico mediante el estudio convencional, demostrado por la presencia de protocolos dispares y heterogéneos entre las diferentes unidades de Anatomía Patológica.^[78] La dificultad de la técnica convencional viene dada principalmente por la interpretación y medición, en las secciones seriadas de las lesiones que comprometen al ganglio en forma tridimensional, obteniendo un resultado en mm, cuando en realidad se trata de una lesión volumétrica; por esta razón la medición semicuantitativa de CK19 de la técnica OSNA estaría representando los mm³ de una lesión metastásica.^[93, 135]

En este estudio de cohortes, la técnica OSNA identificó afectación metastásica del GC en el 35,3% de las pacientes, una frecuencia similar a la apreciada mediante la técnica convencional que identificó afectación del GC en el 26,4% de las pacientes, diferencia sin significación estadística, similar a lo publicado en otras series.^[111, 112] Se ha reportado en algunos estudios que la tasa de micrometástasis detectadas por OSNA es mayor que la detectada por histología convencional.^[102, 110] En nuestra serie la frecuencia de micrometástasis en el GC detectadas por la técnica convencional fue de 10,9% (33/303), y mediante la técnica OSNA de 15,3% (47/306) y la diferencia fue estadísticamente no significativa ($p=0,17$).

Cuando valoramos si la afectación de los GnoC en las pacientes con GC positivo estaba influida por las diferentes técnicas de análisis de los GC, la afectación de los GC mediante la técnica OSNA en micrometástasis y macrometástasis se correlacionó con la frecuencia de GnoC afectados en la linfadenectomía complementaria. De esta manera, el 17,7% (8/45) de las pacientes presentaba otros GnoC afectados después de micrometástasis en el GC obtenido a partir de la

técnica OSNA y el 36% (22/61) presentaba otros GnoC afectos después de un resultado de macrometástasis en el GC ($p=0,08$). En general nuestros resultados son equivalentes a otros estudios publicados con técnicas convencionales donde el riesgo de presentar otras metástasis axilares después de macrometástasis en el GC fue del 40%^[136, 137] y del 15% después de micrometástasis en el GC.^[138, 139] Por otro lado, dependiendo del volumen tumoral de la micrometástasis, la frecuencia de GnoC afectos fue del 10% en micrometástasis entre 0,2-1 mm^[137] y del 20% en micrometástasis entre 1-2 mm.^[138]

En la BSGC en estadios precoces de cáncer de mama se ha demostrado que el GC es el único ganglio positivo en la 2/3 partes de las pacientes.^[40, 113] En nuestro estudio comprobamos que independientemente de la técnica utilizada para analizar el GC, en 62 pacientes (77,5%) en el grupo convencional y en 80 pacientes (74,1%) en el grupo OSNA el GC era el único ganglio positivo.

5.2 Resultado definitivo intraoperatorio: segunda ventaja de la técnica OSNA

En el estudio intraoperatorio de los GC por técnicas convencionales, bien por impronta citológica ó por estudio de corte por congelación, se ha demostrado que existen falsos negativos. Estos falsos negativos, en general se producen en pacientes con micrometástasis, tumores bien diferenciados y en el carcinoma lobulillar infiltrante.^[80-82] Esto implica que cuando existe un falso negativo en el estudio intraoperatorio, el resultado de la afectación del GC se obtiene una vez realizado el estudio anatomopatológico definitivo mediante cortes seriados. Por consiguiente, la linfadenectomía axilar complementaria se ha de realizar en un segundo tiempo sometiendo a la paciente a dos intervenciones quirúrgicas. De hecho, en nuestro estudio en el 35,1% de las pacientes en las cuales el estudio intraoperatorio del GC se realizó mediante la técnica convencional, la linfadenectomía complementaria se realizó en una segunda intervención.

Este enfoque en dos tiempos conlleva un aumento de los costes del sistema de salud, como así también aumento de la morbilidad del paciente (segunda anestesia general, riesgo potencial de complicaciones intraoperatorias y postoperatorias, y mayor tiempo de convalecencia).^[110, 140, 141] No es de extrañar que la linfadenectomía axilar es la alternativa menos costosa para la estadificación axilar de pacientes con cáncer de mama cuando se la compara con la BSGC, ya que esta última requiere equipo (cirujanos entrenados en la técnica quirúrgica) y material especializado (medicina nuclear).^[140]

Desde el punto de vista estrictamente económico, el estudio de cortes por congelación para la detección intraoperatoria de metástasis en los GC es probablemente la parte más importante de la técnica del GC. Se trata de un procedimiento caro debido a la carga de trabajo considerable en el laboratorio de anatomía patología pero que permite realizar la linfadenectomía axilar complementaria en la misma operación. Un resultado falso negativo conduce a la re-intervención aumentando los costes del tratamiento quirúrgico. En el estudio de Ronka et al,^[140] el análisis de sensibilidad reveló que el estudio de cortes por congelación del GC parece ser económicamente rentable, siempre y cuando la tasa de falsos negativos no supere el 35%.

Otra de las principales ventajas de la técnica OSNA es que, al tener el resultado definitivo intraoperatorio, permite evitar el retraso del inicio de las terapias adyuvantes.^[141, 142] En la primera fase de nuestro estudio, se observa que el 100% de las linfadenectomías complementarias después de GC positivos identificados mediante la técnica OSNA se realizó en el mismo acto quirúrgico.

5.3 Desventajas de la técnica OSNA

La técnica OSNA requiere que el ganglio entero se procese. De forma que se evalúan los ganglios linfáticos de forma completa obteniendo un resultado semicuantitativo de ARNm de CK19 expresado en el número de copias por μL para la detección de metástasis ganglionares. Esta homogenización completa del

ganglio linfático implica no tener tejido para realizar el estudio morfológico del GC. Esto hace que determinados parámetros del estudio morfológico se pierdan, tales como el tamaño, la localización y el patrón de la metástasis en los ganglios linfáticos, la extensión extracapsular de una metástasis ó el grado de regresión después de la terapia neoadyuvante.

La falta de material para la realización de estudio morfológico del ganglio centinela cobra especial importancia en aquellas pacientes que simultáneamente presentan dos tumores que pueden tener afectación al mismo grupo ganglionar. El caso de que ambos tumores malignos puedan comprometer el mismo sitio se denomina "Collision tumor".^[143] Esta situación se han descrito en las siguientes circunstancias: 1) cuando dos carcinomas generan metástasis separadas al mismo ganglio linfático; 2) cuando un carcinoma genera metástasis a los ganglios linfáticos afectados de enfermedades linfoproliferativa,^[144] ó 3) cuando el tumor genera una metástasis en otro tumor. En el caso de cáncer de mama, los tumores malignos sincrónicos reportados con más frecuencia incluyen la leucemia linfocítica crónica, la leucemia mieloide aguda, el feocromocitoma y el melanoma maligno.^[145] Otro tipo de lesiones que pueden identificarse en el ganglio centinela son lesiones no tumorales como sarcoidosis o tuberculosis, situaciones también poco frecuentes. Por todo lo anterior se recomienda realizar una impronta citológica de la porción central de los ganglios centinela estudiados por la técnica OSNA con el objetivo de realizar un estudio morfológico mínimo del mismo. La fijación del tejido graso periganglionar podría ser un sustituto para comprobar si hay extensión extracapsular, cuando el resultado del GC es positivo.^[109]

En nuestra serie no se han identificado otras lesiones morfológicas de relevancia en las improntas citológicas de los GC realizadas antes del procesamiento del mismo para ser analizado mediante la técnica OSNA, ni extensión extracapsular en la grasa periganglionar del GC resecada previa al procesamiento dato debido probablemente al tamaño muestral.

Como hemos explicado en la introducción, esta técnica se basa en la determinación semicuantitativa de ARNm de CK19, por tanto, cabría preguntarse

si todos los cánceres de mama expresan la CK19. Se ha demostrado que el 98% de los cánceres de mama expresan la proteína CK19.^[146] Un reciente estudio realizado en pacientes con tipos menos frecuentes de cáncer de mama (carcinomas micropapilares, mucinosos, apócrinos, tubulares, medulares y carcinomas mixtos) ha demostrado que el 100% de los mismos presenta inmunoreactividad a la CK19 mediante microarrays después de repetir la inmunotinción en todo el tejido tumoral cuando hay expresión focal de la misma en la biopsia. Los autores concluyen que la técnica OSNA podría utilizarse en cualquier tipo de cáncer de mama con una probabilidad de falso negativo baja.^[105]

Estos hallazgos son importantes tenerlos en cuenta ya que la evaluación preoperatoria de la CK19 en el tumor primario se realiza en una muestra del mismo, la mayoría de las veces a partir de material obtenido mediante biopsia con aguja gruesa. Por otro lado, otros autores sugieren que la técnica OSNA puede detectar ARNm de CK19 incluso en aquellos tumores que presentan estudio por IHQ negativo para CK19.^[95] En nuestro estudio, todas las pacientes presentaban inmunotinción positiva para CK19 en la biopsia del tumor primario, salvo 1 de 306 (0,32%) en la cual la inmunotinción para CK19 en el trucut diagnóstico fue negativa y después del estudio del GC mediante la técnica OSNA se reevaluó la misma en el tumor resecado identificando inmunoreactividad para CK19 mediante técnicas de microarrays.

Se ha descrito que la técnica OSNA puede sufrir inhibición del proceso lo que no permite categorizarse si se trata de OSNA + u OSNA ++ debido a una interferencia en la reacción molecular. Durante la realización de nuestro estudio no se han presentado reacciones inhibidas de la técnica OSNA. Por otra parte, el lisado obtenido de la homogeneización de los GC debe almacenarse a -70°C, lo que parece suficiente para la preservación del ARNm (se sabe que de esta forma el ARNm puede ser almacenado varios años), para poder asegurar un nuevo análisis de la muestra si fuera necesario.

5.4 Implicaciones de la carga tumoral total

Una vez establecida la validación de la técnica OSNA en nuestro estudio, el siguiente paso es analizar la carga tumoral en los GC determinada por OSNA y valorar las implicaciones de la misma en relación a la afectación de ganglios no centinela y su posible valor predictivo.

El punto de corte de CK19 determinado por Tsujimoto et al.^[93] en el estudio clínico de desarrollo de la técnica OSNA que permite la diferenciación entre macrometástasis y micrometástasis sólo proporciona información sobre la cantidad de carga tumoral de cada GC positivo relacionado con el tamaño patológico convencional de la metástasis del GC. Este grupo de investigadores examinó sistemáticamente nueve ganglios linfáticos con depósitos metastásicos derivados de nueve pacientes con cáncer de mama, y midió el número de copias de ARNm de un depósito metastásico de 8 mm³ (forma no especificada en el artículo original) para identificar la correlación del número de copias de CK19 y el tamaño histopatológico de las metástasis en el GC. Este número de copias varió entre 4700 y 140.000/μl. Basándose en estos datos, el punto de corte para macrometástasis se fijó en 5000 copias/μl.

Este punto de corte nos sirve para dividir las pacientes con macro y micrometástasis y hacer la validación en la Fase I, pero es diferente al concepto que definimos de la TTL de los ganglios centinela. La determinación semicuantitativa de la TTL de los GC a partir de la cuantificación de la CK19 como herramienta predictiva es una ventaja de la técnica OSNA sobre la anatomía patológica convencional. Hemos demostrado con el presente estudio que la TTL obtenida de la sumatoria de la CK19 de los ganglios centinela positivos es una herramienta predictiva de metástasis adicionales de GnoC que se comporta como variable independiente. Basados en estos resultados, se estableció un punto de corte de la TTL que permite predecir la presencia de metástasis adicionales en los GnoC que pueda tener utilidad clínica para la toma de decisiones de completar o no el tratamiento quirúrgico mediante una linfadenectomía axilar.

En nuestra cohorte de pacientes, cuando la TTL fue menor de 120.000 copias/ μL ($1,2 \times 10^5$), la probabilidad de no encontrar más ganglios afectados en la linfadenectomía complementaria fue del 80%, con una especificidad del 85%. Esto se traduce en que, utilizando este punto de corte, 81 pacientes (77%) no tenían más ganglios linfáticos afectados en la LA complementaria, y que sólo 17 pacientes (21%) tenían metástasis ganglionares adicionales en la LA. Por otro lado, cuando la TTL fue mayor de 120.000 copias/ μL ($1,2 \times 10^5$), 13 pacientes (54%) tenían ganglios linfáticos metastásicos adicionales en la linfadenectomía axilar complementaria.

Hemos evaluado si algunos factores pronósticos del tumor primario podrían tener un impacto en estos resultados, y mediante el estudio multivariado se evidenció que sólo el estado de los receptores hormonales influían en la predicción en forma estadísticamente significativa. En los pacientes con RH positivos, cuando la TTL fue menor de 500.000 copias/ μL (5×10^5), la probabilidad de no encontrar más ganglios afectados en la linfadenectomía complementaria fue del 84%, con una especificidad del 87%. Por otro lado, cuando la TTL fue mayor de 500.000 copias/ μL (5×10^5), el 56% de los pacientes tenían ganglios linfáticos metástasis adicionales en la linfadenectomía axilar complementaria. Estos resultados sugieren que en pacientes con receptores hormonales positivos y mayor TTL la posibilidad de tener GnoC positivos en la axila no es despreciable.

Otros estudios también han evaluado el valor predictivo del GC analizado por OSNA [147]. Ohi et al.^[148] han demostrado que a mayor número de copias de ARNm de CK19 se correlaciona significativamente con cuatro o más metástasis axilares, definiendo como punto de corte un valor igual o mayor de 100.000 copias/ μL ($1,0 \times 10^5$). En este estudio la frecuencia de metástasis del GC, OSNA + y OSNA++, fue del 19,3% y 53,4% respectivamente. Llama la atención la frecuencia de afectación axilar en pacientes estudiadas mediante la BSGC, en teoría con ganglios clínicamente negativos. En nuestra serie, el 15,4% de las pacientes presentaron OSNA+ y 19,9% OSNA++. Por otro lado en el estudio de Ohi et al.^[148] la frecuencia de cuatro o más metástasis ganglionares en los GC OSNA + y OSNA ++ fue del 7% y 27,4%, respectivamente. Sin embargo, este

estudio no informa como se obtiene el número de copias que describen como punto de corte, si es de una única metástasis del GC, o es una sumatoria como nuestro trabajo, tampoco realiza un estudio comparativo con el número de GC afectos como variable de predicción. En este mismo sentido, otros ensayos han evaluado las implicaciones probables de la determinación de la carga tumoral de los GC con OSNA. La evaluación más precisa de la carga tumoral en el GC proporcionaría una valiosa herramienta para la evaluación de la categoría de riesgo de los pacientes con cáncer de mama y, a su vez para definir la terapia oncológica.^[110] Por otro lado el estudio multicéntrico español, en el que participa nuestro grupo, determinó que la carga tumoral del GC es una herramienta estandarizada y automatizada que permite predecir el estado de los ganglios axilares en forma independiente y con mayor precisión que el número de ganglios centinela afectados.^[149]

Si bien la cantidad de ganglios centinela afectos es una variable independiente de predicción de otros GnoC afectos, y de hecho se utiliza en los diferentes nomogramas de predicción como variable independiente,^[117, 118] en nuestra cohorte de pacientes, el número de GC positivos (1 ó 2) no muestra diferencias estadísticamente significativas en el análisis univariado, pero que sugiere que el valor de la TTL es mejor predictor del estado de los ganglios no centinela que el número de GC positivos por la técnica convencional.

Por otro lado, el valor pronóstico de la TTL es aún desconocido. Si bien el número de ganglios axilares afectos es un factor pronóstico demostrado y que queda reflejado en la modificación del estadio de la enfermedad según el TNM,^[26] no hay datos de supervivencia global, supervivencia libre de enfermedad ó recurrencia locorregional cuando se valora la TTL. Nuestra hipótesis para futuros estudios es que pacientes con 3 o más ganglios axilares afectos pero con baja TTL tendrían mejor pronóstico que pacientes con 1 ó 2 ganglios afectos con altas TTL.

Por otro lado, el ensayo clínico Z0011 no encontró que el número de GC positivos (bien 1, 2 3 ó más) sea un predictor de recidiva de manera independiente, lo que podría sugerir que estaría justificado prescindir de la linfadenectomía axilar

complementaria en pacientes con GC positivos, independientemente del número de GC resecados.^[150] Si esta afirmación fuera cierta, la TTL como factor pronóstico independiente probablemente tenga mayor impacto como predictor de recurrencia locorregional.

5.5 Perspectiva actual sobre la linfadenectomía axilar en el cáncer de mama precoz

En la primera década del 2000 se han generado diferentes modalidades para tratar de identificar en qué pacientes puede evitarse la LA cuando el GC es positivo, teniendo en cuenta que en este grupo de pacientes, entre el 40 al 60% no tendrá más ganglios afectados en la LA.^[113] Es por esto que en esa época se evidencia una tendencia hacia la omisión LA complementaria en pacientes seleccionados. En el análisis de la base de datos SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results) entre 1998 y 2004, hasta en el 16% de los pacientes con GC positivos no se realizó LA complementaria tendencia que se observa principalmente en pacientes mayores, ó pacientes con tumores de bajo grado, o con receptores de estrógenos positivos. Considerando sólo los pacientes con micrometástasis, la proporción tratada solo con GC aumentó del 21 al 38%.^[151] De manera similar, la revisión de la NCDB (National Cancer Data Base) americana entre 1998 y 2005 reveló que en el 20,8% de los pacientes con GC positivo no se realizó LA complementaria.^[111] Con una media de seguimiento de poco más de cinco años, no hubo diferencias en las tasas de recurrencia axilar o supervivencia para los pacientes que se sometieron a GC exclusivo comparado con aquellos tratados mediante GC seguido de LA. Estos datos sugieren que en determinado grupo de pacientes no hacer una LA después de GC positivo no tendría impacto en la supervivencia ó en la tasa de recurrencia locorregional.

La identificación de qué pacientes con GC positivos podrían beneficiarse de no realizar la LA complementaria ha generado gran debate. Múltiples estudios han identificado diferentes características del tumor primario y del GC metastásico como predictores de GnoC afectados en los cuales la LA estaría justificada. Dentro

de estos estudios el metaanálisis de van la Parra et al.,^[116] ó los modelos matemáticos ó nomogramas del MD Anderson^[118] ó del Memorial Sloan-Kettering,^[117] se validaron para su utilización como ayuda en la toma de decisión de completar o no la LA. Uno de los factores más importantes de la mayoría de estos modelos de predicción de metástasis axilares en pacientes con GC positivo es el tamaño de la metástasis del GC por histología convencional. Por lo que independientemente del tipo de estudio anatomopatológico, lo importante es que la cantidad de tumor en los ganglios centinela (bien por técnicas convencionales o bien por técnica molecular) es un factor predictivo de la afectación de los ganglios no centinela en la axila.

Cuando se realiza el estudio anatomopatológico convencional, como hemos descrito en la primera fase del estudio, muchas de las decisiones acerca de la realización o no de una linfadenectomía cuando el GC es positivo se toman después de cirugía, cuando la anatomía patológica definitiva del tumor mamario y del GC se ha completado. Con la incorporación de la técnica OSNA, calculando la TTL intraoperatoria de los GC positivos se podría generar un modelo de estimación de metástasis adicionales de GnoC como herramienta predictiva para su utilización intraoperatoria, de hecho en la segunda fase de nuestro estudio hemos valorado con qué TTL predecimos el estado de los GnoC.

A partir del año 2010 se han publicado estudios con mayor nivel de evidencia sobre la seguridad oncológica de la no realización de LA en un determinado grupos de pacientes con cáncer de mama. El ensayo clínico Z0011 de la ACOSOG (American College of Surgeons Oncology Group) diseñado para evaluar el riesgo de recidiva locorregional y la supervivencia global de pacientes con cáncer de mama en estadio clínico T1-T2 con metástasis en 1 ó 2 ganglios centinela detectadas mediante la técnica de H&E, tratadas con cirugía conservadora de la mama, radioterapia mamaria y terapia sistémica adyuvante y randomizadas a la realización de una linfadenectomía axilar versus no terapia axilar (ni LA ni radioterapia) demuestra que la LA complementaria en este grupo de pacientes no mejora la recidiva local ni la supervivencia con respecto a los pacientes con una LA.^[122, 123] En este ensayo clínico, el 70% las pacientes

incluidas tenían tumores menores de 2 cm, el 83% expresaban receptores de estrógenos y el 35% sólo tenía una micrometástasis en el ganglio centinela. El 27% de las pacientes del grupo con LA tenía metástasis ganglionares adicionales identificadas en la evaluación histopatológica de la disección axilar, por lo que se asume que las pacientes asignadas al brazo de GC exclusivo presentaban la misma frecuencia de metástasis de ganglios no centinela que no fueron resecaadas. Con una media de seguimiento de 6,3 años, no hubo diferencias estadísticamente significativas en la recidiva local (1,8% en el grupo GC solo versus 3,6% en el grupo GC+LA), recidiva axilar ipsilateral (recurrencia locorregional, un 0,9% en el grupo GC solo versus 2,5% en el grupo de GC+LA), ni diferencias en la supervivencia global (92,5% en el grupo de GC solo vs. el 91,9% en el grupo con GC+LA), ni en la supervivencia libre de enfermedad (83,8 % en el grupo de GC solo vs. el 82,2 % en el grupo con GC+LA).^[123] Estos resultados sugieren que la cirugía axilar no sería necesaria seguir realizándola en pacientes con uno o dos GC positivos que cumplen los criterios de inclusión del Z0011.

En el mismo sentido, el estudio IBCSG 23-01, de fase 3 y de no inferioridad, multicéntrico y aleatorizado, demostró que la LA podía evitarse en pacientes en estadios tempranos de cáncer de mama con micrometástasis en el GC.^[152] En este estudio, se incluyeron pacientes con axila clínicamente negativa y tumor primario de 5 cm o menos, en los que el GC tenía una o más micrometástasis sin extensión extracapsular; y fueron randomizadas a la realización de LA complementaria vs. no tratamiento axilar. Los resultados demostraron que la supervivencia libre de enfermedad a los 5 años fue 87,8% (IC del 95%: 84,4 - 91,2) en el grupo sin disección axilar y 84,4% (IC del 95%: 80,7 – 88,1) en el grupo con disección axilar ($p=0,16$); con un HR de no inferioridad de 0,78 (IC del 95%: 0,55 – 1,11) sin disección axilar vs disección axilar ($p=0,0042$). Es de destacar que en este estudio el tratamiento quirúrgico del tumor primario se realizó mediante mastectomía en el 9 % de las pacientes incluidas.

Estos hallazgos han cambiado la práctica clínica habitual en el manejo de estos pacientes en la mayoría de las instituciones.^[153] Sin embargo, aunque algunas

guías clínicas actuales recomiendan aún como práctica estándar completar la linfadenectomía axilar en pacientes con metástasis del GC, otras ya han incluido los resultados de estos estudios para no hacerlo.^[154, 155] Por otro lado, el grupo de expertos de la decimotercera Conferencia Internacional de Cáncer de Mama de St. Gallen evaluó y aprobó las nuevas evidencias sustanciales en los aspectos de las terapias locales y regionales para el cáncer de mama precoz, en particular sobre cirugía menos extensa a nivel de la axila. En esta última edición se concluyó que la LA puede omitirse con seguridad en pacientes con uno o dos ganglios centinela positivos después de la cirugía conservadora de la mama cuando se planea radioterapia de toda la mama y terapia sistémica. En los otros grupos como aquellas pacientes con tres o más ganglios centinela metastásicos, o si los ganglios están afectados clínicamente antes de la cirugía (confirmado por biopsia), la linfadenectomía axila es obligada.^[156] Por lo cual, omitir la LA en el grupo de pacientes del Z0011 permitiría evitar la morbilidad asociada a la misma sin afectar al resultado oncológico.

No obstante, se ha generado gran debate sobre la aplicabilidad de los resultados del estudio Z0011 en los subgrupos de pacientes que estaban infra representados o no definidos en el ensayo. Todas estas cuestiones relacionadas han sido ampliamente discutidas en diferentes artículos o foros de expertos, sin embargo hay aún un grupo determinado de pacientes que cumplen los criterios de inclusión del Z0011 en los que se realiza LA complementaria, como lo demuestran incluso algunos autores del propio estudio Z0011. Caudle et al.,^[157] realizaron un estudio comparativo de la era pre y post-Z0011 en el que demuestra que en la era pre-Z0011 el 85% de las pacientes se realizaba la LA complementaria comparado con la era post-Z0011 donde solo se realizaba en el 24%, una diferencia estadísticamente significativa. En la era post-Z0011 los cirujanos eran más propensos a realizar LA complementaria en pacientes con tumores de mayor tamaño (1,5 vs 2,2 cm; $p=0,001$), con histología lobulillar ($p=0,01$), en los que resecaban escasos GC (1 vs. 3 GC), en las que presentaban metástasis de GC de mayor tamaño (4 vs. 2,5 mm), en las que presentaban extensión extracapsular ($p=0,16$) ó en aquellas con alta probabilidad de presentar GnoC afectos por el nomograma del MD Anderson ($p=0,03$).

Por lo cual hay un grupo de pacientes en los que, ya sea porque son de alto riesgo ó porque están infra representados por la población del Z0011, donde hay debate acerca de realizar la LA después de GC positivo. En este sentido, la TTL del GC obtenida en forma intraoperatoria por OSNA como herramienta de predicción de otros GnoC afectos podría utilizarse como guía para orientar la decisión quirúrgica de este grupo de pacientes.

Otro debate surgido a raíz de la publicación del Z0011 es la necesidad de realización del estudio intraoperatorio del GC. Aunque el estudio intraoperatorio se ha reducido desde la aparición del Z0011 (se ha publicado que ha disminuido del 69% en la era pre-Z0011 al 29% posterior), aún se realiza en los pacientes más jóvenes, con mayor tamaño tumoral, con histología ductal, ó con tumores de alto grado histológico.^[157] Esto es valorando la técnica patológica convencional, pero si consideramos que todavía hay pacientes que no están incluidos en el Z0011 o que están infra representados, el valor de la TTL puede sernos útil para analizar la predicción del estado de los GnoC. Es por ello que la evaluación intraoperatoria de la carga tumoral total sigue siendo útil en la práctica clínica diaria, ya que proporciona información predictiva adicional a considerar en algunos grupos de pacientes, permitiendo que la decisión de completar la cirugía axilar se realice en la misma intervención con la mayor información disponible posible.

5.6 La Carga Tumoral Total como herramienta de predicción

En nuestro estudio el poder de discriminación de la TTL obtenida a partir de la técnica OSNA fue cuantificada mediante la curva ROC medida por el área bajo la curva (AUC). El AUC proporciona una medida de si la clasificación relativa de predicciones individuales está en el orden correcto. La TTL, como herramienta predictiva de GnoC afectos, presenta un AUC de 0,71 (IC del 95%, 0,59 – 0,83). Según nuestros resultados, el poder de discriminación de predicción considerando la TTL como variable única e independiente se compara favorablemente con el AUC de nomogramas^[117, 118] desarrollados para predecir las metástasis de GnoC

en pacientes con GC positivo en los que se utilizan múltiples variables anatomopatológicas. Al evaluar la TTL en nuestra cohorte de pacientes, sólo el 21% de los pacientes hubiera presentado metástasis ganglionares axilares adicionales si no se hubiera realizado la LA complementaria comparado con la frecuencia del 27% descrita en el estudio Z0011.

Al evaluar la frecuencia de GnoC afectos después de presentar GC positivos dependiendo de la técnica de evaluación histológica del GC, Castellano et al.,^[110] demostró que la tasa de metástasis en la LA después de GC positivo no fue significativamente diferente cuando se compararon los pacientes en el grupo de la técnica OSNA con la histología convencional. En nuestra serie, el 28,6% de las pacientes evaluadas mediante la técnica convencional presentaban GnoC afectos en la LA, comparado con el 22% de las pacientes evaluadas mediante la técnica OSNA, diferencia no estadísticamente significativa ($p=0,74$).

Es de destacar que a partir de nuestros resultados evidenciamos que la predicción de la TTL en determinar los GnoC afectos se comporta en forma directamente proporcional en el caso de las macrometástasis en el GC (macrometástasis con mayor TTL presentan mayor probabilidad de presentar GnoC afectos) con un OR de 1,93 (IC 95%: 1,08 – 3,43), mientras que en el caso de las micrometástasis en el GC, la TTL se comporta de forma constante, independientemente del número de copias con un 0,63 (IC 95%: 0,08 – 4,52). Estos datos son comparables con lo publicado recientemente en la bibliografía.^[158]

Nuestro estudio tiene las limitaciones de cualquier otro estudio de cohortes que con frecuencia están sujetos a sesgos. Otra limitación es la implicación clínica de la TTL en la manera de gestionar quirúrgicamente pacientes con GC positivos y la repercusión pronóstica que esto conlleva. Para resolver estos interrogantes sería necesario diseñar nuevos estudios en los cuales a partir de la TTL se tome la decisión de realizar o no la LA complementaria y evaluar prospectivamente el efecto de dicha intervención con el pronóstico de las pacientes en términos de tasa de recurrencia locorregional y supervivencia global. En los mismos términos

diseñar un nomograma que incluya como variable la TTL y de la misma forma determinar el efecto del mismo a nivel pronóstico.

5.7 Influencia de la expresión génica del tumor primario en la disección axilar

En los últimos años se ha determinado la expresión génica de los tumores de mama a partir del análisis de microarrays de ADN caracterizando los mismo según los diferentes patrones de expresión génica.^[124] Como resultado de esto se han clasificado los cánceres de mama en función del pronóstico y del valor predictivo de dichos perfiles.^[125, 159] Y estos perfiles de expresión génica se están utilizando para determinar la necesidad de tratamiento adyuvante adicional de pacientes con cáncer de mama.

Dentro de estos estudios de perfiles génicos están los subtipos moleculares.^[124] Cuando analizamos la influencia de la determinación histológica (convencional vs. molecular) del GC en función de los subtipos, encontramos en nuestro estudio que no hay diferencias significativas en cuanto a la afectación del GC. Además al analizar si los subtipos moleculares influían como factor de predicción de GnoC afectos en relación con la TTL, no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas en el estudio univariado.

Por otro lado, si la expresión génica de los tumores puede ser utilizada para la selección de pacientes que se beneficiarían o no de una LA aún está por determinar. En este sentido, los resultados de ensayos clínicos en marcha permitirán identificar si pacientes con bajo riesgo molecular de recidiva, derivado de firmas génicas, y determinar si se beneficiarían o no de tratamiento hormonoterápico adyuvante +/- quimioterapia independiente del número de ganglios linfáticos axilares positivos.^[160] En la actualidad, la información que proporcionan los perfiles de expresión génica de los tumores no tiene un impacto en el manejo quirúrgico de los pacientes.

6. CONCLUSIONES

1. La comparación de las dos poblaciones de estudio (la cohorte de casos estudiada mediante la técnica OSNA y la cohorte control estudiada mediante la técnica convencional) no demostraron diferencias significativas en cuanto a las características generales de las pacientes como a las características generales de los tumores.
2. La comparación de la tasa de detección de ganglios centinela negativos o positivos mediante técnica convencional, con la tasa de detección de la técnica OSNA, no demostró diferencias estadísticamente significativas. La tasa de detección de ganglios centinela negativos fue: 73,6% mediante la técnica convencional y del 64,7% mediante la técnica OSNA; y la tasa de ganglios centinela positivos fue: 26,4% mediante la técnica convencional y del 35,3% mediante la técnica OSNA.
3. En nuestra serie hemos encontrado una tasa similar de micro y macrometástasis en el GC analizados por la técnica OSNA en comparación con la técnica convencional. De las metástasis detectadas mediante la técnica OSNA, el 56,5% eran macrometástasis y el 43,5% micrometástasis, en comparación con las detectadas mediante la técnica convencional donde el 58,8% eran macrometástasis y el 41,2% micrometástasis; estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.
4. El estudio intraoperatorio del GC mediante la técnica OSNA permitiría reducir la necesidad de una segunda cirugía en el 35,1% de los pacientes.
5. Estos resultados permiten la validación de la técnica OSNA para la detección de metástasis del GC de pacientes con cáncer de mama en estadios precoces.
6. La carga tumoral total de los ganglios centinela metastásicos determinada a partir del resultado semicuantitativo de ARNm de la citoqueratina 19 obtenida mediante la técnica OSNA tiene valor predictivo del estado de

otros ganglios no centinela axilares con un OR de 1,69 (IC 95%: 1,19 – 2,41).

7. La carga tumoral total de los ganglios centinela afectados determinada mediante la técnica OSNA se comporta como variable independiente predictora de otros ganglios no centinela metastásicos de la linfadenectomía axilar complementaria influenciada sólo por los receptores hormonales con un OR de 0,06 (IC 95%: 0,01 – 0,60) y un área bajo la curva ROC de 0,7149 (IC 95%: 0,59 – 0,83).
8. El punto de corte elegido de carga tumoral total que presente una especificidad con un valor predictivo negativo de utilidad clínica de predicción de ganglios no centinela afectados fue de 120.000 copias/ μ L, que representa un VPN de 80% y una especificidad de 85,5%, para toda la población estudiada.
9. El punto de corte de la carga tumoral total en la población con receptores hormonales positivos que presenta una especificidad con un valor predictivo negativo de utilidad clínica de predicción de ganglios no centinela afectados fue de 500.000 copias/ μ L, que representa un VPN de 83,7% y una especificidad de 86,7%.
10. La carga tumoral total de los ganglios centinela metastásicos se considera una nueva herramienta predictiva que puede ser utilizada en forma adicional para guiar las decisiones clínicas sobre la realización de una linfadenectomía axilar complementaria en pacientes con cáncer de mama y ganglio centinela positivo.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Statistical Information Team, Cancer Research UK, Breast cancer. 2009. <http://info.cancerresearchuk.org/cancerstats/>.
2. AECC. Asociación Española Contra el Cáncer. <https://http://www.aecc.es/SobreElCancer/CancerPorLocalizacion/CancerMama/Paginas/incidencia.aspx>. 2012 [updated 17/04/2014].
3. Sant M, Allemani C, Santaquilani M, et al. EURO CARE-4. Survival of cancer patients diagnosed in 1995-1999. Results and commentary. *Eur J Cancer*. 2009 Apr;45(6):931-91.
4. Cancer Facts & Figures 2013. American Cancer Society.; Available from: <http://www.cancer.org/research/index>.
5. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. España. Mortalidad por causa de muerte, España y comunidades autónomas. Series 1981 - 2007. <http://www.msssi.gob.es/estadEstudios/estadisticas/estadisticas/estMinisterio/mortalidad/seriesTablas.htm>.
6. Deapen D, Liu L, Perkins C, et al. Rapidly rising breast cancer incidence rates among Asian-American women. *Int J Cancer*. 2002 Jun 10;99(5):747-50.
7. OECD (2010), Health at a Glance: Europe 2010, OECD Publishing. http://dx.doi.org/10.1787/health_glance-2010-en.
8. Fisher B, Jeong JH, Anderson S, et al. Twenty-five-year follow-up of a randomized trial comparing radical mastectomy, total mastectomy, and total mastectomy followed by irradiation. *N Engl J Med*. 2002 Aug 22;347(8):567-75.
9. Veronesi U, Luini A, Del Vecchio M, et al. Radiotherapy after breast-preserving surgery in women with localized cancer of the breast. *N Engl J Med*. 1993 Jun 3;328(22):1587-91.
10. Fisher B, Montague E, Redmond C, et al. Comparison of radical mastectomy with alternative treatments for primary breast cancer. A first report of results

- from a prospective randomized clinical trial. *Cancer*. 1977 Jun;39(6 Suppl):2827-39.
11. Orr RK. The impact of prophylactic axillary node dissection on breast cancer survival--a Bayesian meta-analysis. *Ann Surg Oncol*. 1999 Jan-Feb;6(1):109-16.
 12. Halsted WS. I. The Results of Operations for the Cure of Cancer of the Breast Performed at the Johns Hopkins Hospital from June, 1889, to January, 1894. *Ann Surg*. 1894 Nov;20(5):497-555.
 13. Halsted WS. I. The Results of Radical Operations for the Cure of Carcinoma of the Breast. *Ann Surg*. 1907 Jul;46(1):1-19.
 14. Patey DH, Dyson WH. The prognosis of carcinoma of the breast in relation to the type of operation performed. *Br J Cancer*. 1948 Mar;2(1):7-13.
 15. Fisher B. Laboratory and clinical research in breast cancer--a personal adventure: the David A. Karnofsky memorial lecture. *Cancer Res*. 1980 Nov;40(11):3863-74.
 16. Fisher B. Sounding board. Breast-cancer management: alternatives to radical mastectomy. *N Engl J Med*. 1979 Aug 9;301(6):326-8.
 17. Fisher B, Redmond C, Fisher ER, et al. Ten-year results of a randomized clinical trial comparing radical mastectomy and total mastectomy with or without radiation. *N Engl J Med*. 1985 Mar 14;312(11):674-81.
 18. Truong PT, Bernstein V, Wai E, et al. Age-related variations in the use of axillary dissection: a survival analysis of 8038 women with T1-ST2 breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2002 Nov 1;54(3):794-803.
 19. Joslyn SA, Konety BR. Effect of axillary lymphadenectomy on breast carcinoma survival. *Breast Cancer Res Treat*. 2005 May;91(1):11-8.

20. Hayward J, Caleffi M. The significance of local control in the primary treatment of breast cancer. Lucy Wortham James clinical research award. Arch Surg. 1987 Nov;122(11):1244-7.
21. Cabanes PA, Salmon RJ, Vilcoq JR, et al. Value of axillary dissection in addition to lumpectomy and radiotherapy in early breast cancer. The Breast Carcinoma Collaborative Group of the Institut Curie. Lancet. 1992 May 23;339(8804):1245-8.
22. Fisher B, Bauer M, Wickerham DL, 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.
23. Weaver DL, Ashikaga T, Krag DN, et al. Effect of occult metastases on survival in node-negative breast cancer. N Engl J Med. 2011 Feb 3;364(5):412-21.
24. Harris L, Fritsche H, Mennel R, et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. J Clin Oncol. 2007 Nov 20;25(33):5287-312.
25. Hilsenbeck SG, Ravdin PM, de Moor CA, et al. Time-dependence of hazard ratios for prognostic factors in primary breast cancer. Breast Cancer Res Treat. 1998;52(1-3):227-37.
26. Edge SB BD, Compton CC, Fritz AG et al. AJCC cancer staging manual, Seven Edition. New York, NY: Springer; 2010.
27. Deutsch M, Land S, Begovic M, et al. The incidence of arm edema in women with breast cancer randomized on the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project study B-04 to radical mastectomy versus total mastectomy and radiotherapy versus total mastectomy alone. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2008 Mar 15;70(4):1020-4.
28. Erickson VS, Pearson ML, Ganz PA, et al. Arm edema in breast cancer patients. J Natl Cancer Inst. 2001 Jan 17;93(2):96-111.

29. Mortimer PS BD, Brassington HD. The prevalence of arm oedema following treatment for breast cancer. *Q J MeD*. 1996;89:377–80.
30. Moskovitz AH, Anderson BO, Yeung RS, et al. Axillary web syndrome after axillary dissection. *Am J Surg*. 2001 May;181(5):434-9.
31. Freeman SR, Washington SJ, Pritchard T, et al. Long term results of a randomised prospective study of preservation of the intercostobrachial nerve. *Eur J Surg Oncol*. 2003 Apr;29(3):213-5.
32. Roses DF, Brooks AD, Harris MN, et al. Complications of level I and II axillary dissection in the treatment of carcinoma of the breast. *Ann Surg*. 1999 Aug;230(2):194-201.
33. Vitug AF, Newman LA. Complications in breast surgery. *Surg Clin North Am*. 2007 Apr;87(2):431-51, x.
34. Krag DN, Weaver DL, Alex JC, et al. 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.
35. Giuliano AE, Kirgan DM, Guenther JM, et al. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. *Ann Surg*. 1994 Sep;220(3):391-8; discussion 8-401.
36. Lyman GH, Giuliano AE, Somerfield MR, et al. American Society of Clinical Oncology guideline recommendations for sentinel lymph node biopsy in early-stage breast cancer. *J Clin Oncol*. 2005 Oct 20;23(30):7703-20.
37. Krag D, Weaver D, Ashikaga T, et al. The sentinel node in breast cancer--a multicenter validation study. *N Engl J Med*. 1998 Oct 1;339(14):941-6.
38. Giuliano AE, Jones RC, Brennan M, et al. Sentinel lymphadenectomy in breast cancer. *J Clin Oncol*. 1997 Jun;15(6):2345-50.
39. Giuliano AE, Dale PS, Turner RR, et al. Improved axillary staging of breast cancer with sentinel lymphadenectomy. *Ann Surg*. 1995 Sep;222(3):394-9.

40. Albertini JJ, Lyman GH, Cox C, et al. Lymphatic mapping and sentinel node biopsy in the patient with breast cancer. *JAMA*. 1996 Dec 11;276(22):1818-22.
41. Veronesi U, Paganelli G, Galimberti V, 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.
42. Mansel RE, Fallowfield L, Kissin M, et al. Randomized multicenter trial of sentinel node biopsy versus standard axillary treatment in operable breast cancer: the ALMANAC Trial. *J Natl Cancer Inst*. 2006 May 3;98(9):599-609.
43. Krag D, Harlow S, Weaver D, et al. Technique of sentinel node resection in melanoma and breast cancer: probe-guided surgery and lymphatic mapping. *Eur J Surg Oncol*. 1998 Apr;24(2):89-93.
44. McMasters KM, Tuttle TM, Carlson DJ, et al. Sentinel lymph node biopsy for breast cancer: a suitable alternative to routine axillary dissection in multi-institutional practice when optimal technique is used. *J Clin Oncol*. 2000 Jul;18(13):2560-6.
45. Shivers S, Cox C, Leight G, et al. Final results of the Department of Defense multicenter breast lymphatic mapping trial. *Ann Surg Oncol*. 2002 Apr;9(3):248-55.
46. Bergkvist L, Frisell J, Liljegren G, et al. Multicentre study of detection and false-negative rates in sentinel node biopsy for breast cancer. *Br J Surg*. 2001 Dec;88(12):1644-8.
47. Gill PG. Sentinel lymph node biopsy versus axillary clearance in operable breast cancer: The RACS SNAC trial, a multicenter randomized trial of the Royal Australian College of Surgeons (RACS) Section of Breast Surgery, in collaboration with the National Health and Medical Research Council Clinical Trials Center. *Ann Surg Oncol*. 2004 Mar;11(3 Suppl):216S-21S.

48. Zavagno G, De Salvo GL, Scalco G, et al. A Randomized clinical trial on sentinel lymph node biopsy versus axillary lymph node dissection in breast cancer: results of the Sentinella/GIVOM trial. *Ann Surg.* 2008 Feb;247(2):207-13.
49. Rubio IT, Korourian S, Cowan C, et al. Sentinel lymph node biopsy for staging breast cancer. *Am J Surg.* 1998 Dec;176(6):532-7.
50. Kim T, Giuliano AE, Lyman GH. Lymphatic mapping and sentinel lymph node biopsy in early-stage breast carcinoma: a metaanalysis. *Cancer.* 2006 Jan 1;106(1):4-16.
51. Singletary SE, Allred C, Ashley P, et al. Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol.* 2002 Sep 1;20(17):3628-36.
52. Veronesi U, Viale G, Paganelli G, et al. Sentinel lymph node biopsy in breast cancer: ten-year results of a randomized controlled study. *Ann Surg.* 2010 Apr;251(4):595-600.
53. Veronesi U, Paganelli G, Viale G, et al. A randomized comparison of sentinel-node biopsy with routine axillary dissection in breast cancer. *N Engl J Med.* 2003 Aug 7;349(6):546-53.
54. Veronesi U, Paganelli G, Viale G, et al. Sentinel-lymph-node biopsy as a staging procedure in breast cancer: update of a randomised controlled study. *Lancet Oncol.* 2006 Dec;7(12):983-90.
55. Krag DN, Anderson SJ, Julian TB, 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.
56. Krag DN, Anderson SJ, Julian TB, 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.
57. Olson JA, Jr., McCall LM, Beitsch P, et al. Impact of immediate versus delayed axillary node dissection on surgical outcomes in breast cancer patients with positive sentinel nodes: results from American College of Surgeons Oncology Group Trials Z0010 and Z0011. *J Clin Oncol.* 2008 Jul 20;26(21):3530-5.
 58. Giuliano AE, Haigh PI, Brennan MB, et al. Prospective observational study of sentinel lymphadenectomy without further axillary dissection in patients with sentinel node-negative breast cancer. *J Clin Oncol.* 2000 Jul;18(13):2553-9.
 59. Lucci A, McCall LM, Beitsch PD, et al. Surgical complications associated with sentinel lymph node dissection (SLND) plus axillary lymph node dissection compared with SLND alone in the American College of Surgeons Oncology Group Trial Z0011. *J Clin Oncol.* 2007 Aug 20;25(24):3657-63.
 60. Thompson M, Korourian S, Henry-Tillman R, et al. Axillary reverse mapping (ARM): a new concept to identify and enhance lymphatic preservation. *Ann Surg Oncol.* 2007 Jun;14(6):1890-5.
 61. Purushotham AD, Upponi S, Klevesath MB, et al. Morbidity after sentinel lymph node biopsy in primary breast cancer: results from a randomized controlled trial. *J Clin Oncol.* 2005 Jul 1;23(19):4312-21.
 62. de Boer M, van Deurzen CH, van Dijck JA, et al. Micrometastases or isolated tumor cells and the outcome of breast cancer. *N Engl J Med.* 2009 Aug 13;361(7):653-63.
 63. Van Diest PJ, Torrença H, Borgstein PJ, et al. Reliability of intraoperative frozen section and imprint cytological investigation of sentinel lymph nodes in breast cancer. *Histopathology.* 1999 Jul;35(1):14-8.

64. Rahusen FD, Pijpers R, Van Diest PJ, et al. The implementation of the sentinel node biopsy as a routine procedure for patients with breast cancer. *Surgery*. 2000 Jul;128(1):6-12.
65. Liu LH, Siziopikou KP, Gabram S, et al. Evaluation of axillary sentinel lymph node biopsy by immunohistochemistry and multilevel sectioning in patients with breast carcinoma. *Arch Pathol Lab Med*. 2000 Nov;124(11):1670-3.
66. Weiser MR, Montgomery LL, Susnik B, et al. Is routine intraoperative frozen-section examination of sentinel lymph nodes in breast cancer worthwhile? *Ann Surg Oncol*. 2000 Oct;7(9):651-5.
67. Jensen AJ, Naik AM, Pommier RF, et al. Factors influencing accuracy of axillary sentinel lymph node frozen section for breast cancer. *Am J Surg*. 2010 May;199(5):629-35.
68. Geertsema D, Gobardhan PD, Madsen EV, et al. Discordance of intraoperative frozen section analysis with definitive histology of sentinel lymph nodes in breast cancer surgery: complementary axillary lymph node dissection is irrelevant for subsequent systemic therapy. *Ann Surg Oncol*. 2010 Oct;17(10):2690-5.
69. Tille JC, Egger JF, Devillaz MC, et al. Frozen section in axillary sentinel lymph nodes for diagnosis of breast cancer micrometastasis. *Anticancer Res*. 2009 Nov;29(11):4711-6.
70. Fritzsche FR, Reineke T, Morawietz L, et al. Pathological processing techniques and final diagnosis of breast cancer sentinel lymph nodes. *Ann Surg Oncol*. 2010 Nov;17(11):2892-8.
71. van Diest PJ, van Deurzen CH, Cserni G. Pathology issues related to SN procedures and increased detection of micrometastases and isolated tumor cells. *Breast Dis*. 2010;31(2):65-81.
72. Weaver DL. Pathology evaluation of sentinel lymph nodes in breast cancer: protocol recommendations and rationale. *Modern pathology : an official*

- journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc. 2010 May;23 Suppl 2:S26-32.
73. Vanderveen KA, Ramsamooj R, Bold RJ. A prospective, blinded trial of touch prep analysis versus frozen section for intraoperative evaluation of sentinel lymph nodes in breast cancer. *Ann Surg Oncol*. 2008 Jul;15(7):2006-11.
 74. Motomura K, Inaji H, Komoike Y, et al. Intraoperative sentinel lymph node examination by imprint cytology and frozen sectioning during breast surgery. *Br J Surg*. 2000 May;87(5):597-601.
 75. Turner RR, Hansen NM, Stern SL, et al. Intraoperative examination of the sentinel lymph node for breast carcinoma staging. *Am J Clin Pathol*. 1999 Nov;112(5):627-34.
 76. Upender S, Mohan H, Handa U, et al. Intraoperative evaluation of sentinel lymph nodes in breast carcinoma by imprint cytology, frozen section and rapid immunohistochemistry. *Diagnostic cytopathology*. 2009 Dec;37(12):871-5.
 77. Cserni G. Effect of increasing the surface sampled by imprint cytology on the intraoperative assessment of axillary sentinel lymph nodes in breast cancer patients. *Am Surg*. 2003 May;69(5):419-23.
 78. Cserni G, Amendoeira I, Apostolikas N, et al. Discrepancies in current practice of pathological evaluation of sentinel lymph nodes in breast cancer. Results of a questionnaire based survey by the European Working Group for Breast Screening Pathology. *J Clin Pathol*. 2004 Jul;57(7):695-701.
 79. Rubio IT, Korourian S, Cowan C, et al. Use of touch preps for intraoperative diagnosis of sentinel lymph node metastases in breast cancer. *Ann Surg Oncol*. 1998 Dec;5(8):689-94.
 80. Dabbs DJ, Fung M, Johnson R. Intraoperative cytologic examination of breast sentinel lymph nodes: test utility and patient impact. *Breast J*. 2004 May-Jun;10(3):190-4.

81. Clarke D, Leung E, Chachlani N, et al. Intraoperative assessment of sentinel node using imprint cytology. *World J Surg.* 2010 Jan;34(1):55-61.
82. Guidroz JA, Johnson MT, Scott-Conner CE, et al. The use of touch preparation for the evaluation of sentinel lymph nodes in breast cancer. *Am J Surg.* 2010 Jun;199(6):792-6.
83. van Diest PJ, Peterse HL, Borgstein PJ, et al. Pathological investigation of sentinel lymph nodes. *European journal of nuclear medicine.* 1999 Apr;26(4 Suppl):S43-9.
84. Cserni G, Amendoeira I, Apostolikas N, 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.
85. Hunt KK, Ballman KV, McCall LM, et al. Factors Associated With Local-Regional Recurrence After a Negative Sentinel Node Dissection: Results of the ACOSOG Z0010 Trial. *Ann Surg.* 2012 Sep;256(3):428-36.
86. Veronesi U, Zurrída S, Galimberti V. Consequences of sentinel node in clinical decision making in breast cancer and prospects for future studies. *Eur J Surg Oncol.* 1998 Apr;24(2):93-5.
87. Veronesi U, Zurrída S, Mazzarol G, et al. Extensive frozen section examination of axillary sentinel nodes to determine selective axillary dissection. *World J Surg.* 2001 Jun;25(6):806-8.
88. Zurrída S, Mazzarol G, Galimberti V, et al. The problem of the accuracy of intraoperative examination of axillary sentinel nodes in breast cancer. *Ann Surg Oncol.* 2001 Dec;8(10):817-20.
89. Nahrig JM, Richter T, Kuhn W, et al. Intraoperative examination of sentinel lymph nodes by ultrarapid immunohistochemistry. *Breast J. [Evaluation Studies].* 2003 Jul-Aug;9(4):277-81.

90. Krishnamurthy S, Meric-Bernstam F, Lucci A, et al. A prospective study comparing touch imprint cytology, frozen section analysis, and rapid cytokeratin immunostain for intraoperative evaluation of axillary sentinel lymph nodes in breast cancer. *Cancer*. 2009 Apr 1;115(7):1555-62.
91. Giuliano AE. Intradermal blue dye to identify sentinel lymph node in breast cancer. *Lancet*. 1997 Sep 27;350(9082):958.
92. Litz CE, Beitsch PD, Roberts CA, et al. Intraoperative cytologic diagnosis of breast sentinel lymph nodes in the routine, nonacademic setting: a highly specific test with limited sensitivity. *Breast J*. 2004 Sep-Oct;10(5):383-7.
93. Tsujimoto M, Nakabayashi K, Yoshidome K, et al. One-step nucleic acid amplification for intraoperative detection of lymph node metastasis in breast cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2007 Aug;13(16):4807-16.
94. Visser M, Jiwa M, Horstman A, et al. Intra-operative rapid diagnostic method based on CK19 mRNA expression for the detection of lymph node metastases in breast cancer. *Int J Cancer*. 2008 Jun;122(11):2562-7.
95. Schem C, Maass N, Bauerschlag DO, et al. One-step nucleic acid amplification-a molecular method for the detection of lymph node metastases in breast cancer patients; results of the German study group. *Virchows Arch*. 2009 Feb;454(2):203-10.
96. Tamaki Y, Akiyama F, Iwase T, 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(8):2879-84.
97. Snook KL, Layer GT, Jackson PA, et al. Multicentre evaluation of intraoperative molecular analysis of sentinel lymph nodes in breast carcinoma. *Br J Surg*. 2011 Apr;98(4):527-35.

98. Feldman S, Krishnamurthy S, Gillanders W, et al. A novel automated assay for the rapid identification of metastatic breast carcinoma in sentinel lymph nodes. *Cancer*. 2011 Jun;117(12):2599-607.
99. Smith PA, Harlow SP, Krag DN, et al. Submission of lymph node tissue for ancillary studies decreases the accuracy of conventional breast cancer axillary node staging. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 1999 Aug;12(8):781-5.
100. Cserni G. Mapping metastases in sentinel lymph nodes of breast cancer. *Am J Clin Pathol*. 2000 Mar;113(3):351-4.
101. Diaz LK, Hunt K, Ames F, et al. Histologic localization of sentinel lymph node metastases in breast cancer. *Am J Surg Pathol*. 2003 Mar;27(3):385-9.
102. 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.
103. Bernet L, Cano R, Martinez M, et al. Diagnosis of the sentinel lymph node in breast cancer: a reproducible molecular method: a multicentric Spanish study. *Histopathology*. 2011 May;58(6):863-9.
104. Le Frere-Belda MA, Bats AS, Gillaizeau F, 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.
105. Alvarenga CA, Paravidino PI, Alvarenga M, et al. Expression of CK19 in invasive breast carcinomas of special histological types: implications for the use of one-step nucleic acid amplification. *J Clin Pathol*. 2011 Jun;64(6):493-7.
106. Bostick PJ, Chatterjee S, Chi DD, et al. Limitations of specific reverse-transcriptase polymerase chain reaction markers in the detection of metastases in the lymph nodes and blood of breast cancer patients. *J Clin Oncol*. 1998 Aug;16(8):2632-40.

107. Osako T, Iwase T, Kimura K, et al. Intraoperative molecular assay for sentinel lymph node metastases in early stage breast cancer: a comparative analysis between one-step nucleic acid amplification whole node assay and routine frozen section histology. *Cancer*. 2011 Oct 1;117(19):4365-74.
108. Khaddage A, Berremila SA, Forest F, et al. Implementation of molecular intra-operative assessment of sentinel lymph node in breast cancer. *Anticancer Res*. 2011 Feb;31(2):585-90.
109. Laia BV, Marcos MB, Refael CM, et al. Molecular diagnosis of sentinel lymph nodes for breast cancer: one step ahead for standardization. *Diagn Mol Pathol*. 2011 Mar;20(1):18-21.
110. Castellano I, Macri L, Deambrogio C, et al. Reliability of whole sentinel lymph node analysis by one-step nucleic acid amplification for intraoperative diagnosis of breast cancer metastases. *Ann Surg*. 2012 Feb;255(2):334-42.
111. Bilimoria KY, Bentrem DJ, Hansen NM, 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.
112. Straver ME, Meijnen P, van Tienhoven G, et al. Sentinel node identification rate and nodal involvement in the EORTC 10981-22023 AMAROS trial. *Ann Surg Oncol*. 2010 Jul;17(7):1854-61.
113. Abdessalam SF, Zervos EE, Prasad M, 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.
114. Jakub JW, Bryant K, Huebner M, et al. The number of axillary lymph nodes involved with metastatic breast cancer does not affect outcome as long as all disease is confined to the sentinel lymph nodes. *Ann Surg Oncol*. 2011 Jan;18(1):86-93.

115. Bolster MJ, Peer PG, Bult P, et al. Risk factors for non-sentinel lymph node metastases in patients with breast cancer. The outcome of a multi-institutional study. *Ann Surg Oncol*. 2007 Jan;14(1):181-9.
116. van la Parra RF, Peer PG, Ernst MF, et al. Meta-analysis of predictive factors for non-sentinel lymph node metastases in breast cancer patients with a positive SLN. *Eur J Surg Oncol*. 2011 Apr;37(4):290-9.
117. Van Zee KJ, Manasseh DM, Bevilacqua JL, et al. A nomogram for predicting the likelihood of additional nodal metastases in breast cancer patients with a positive sentinel node biopsy. *Ann Surg Oncol*. 2003 Dec;10(10):1140-51.
118. Mittendorf EA, Hunt KK, Boughey JC, et al. Incorporation of sentinel lymph node metastasis size into a nomogram predicting nonsentinel lymph node involvement in breast cancer patients with a positive sentinel lymph node. *Ann Surg*. 2012 Jan;255(1):109-15.
119. Ozmen V, Karanlik H, Cabioglu N, et al. Factors predicting the sentinel and non-sentinel lymph node metastases in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2006 Jan;95(1):1-6.
120. Naik AM, Fey J, Gemignani M, et al. The risk of axillary relapse after sentinel lymph node biopsy for breast cancer is comparable with that of axillary lymph node dissection: a follow-up study of 4008 procedures. *Ann Surg*. 2004 Sep;240(3):462-8; discussion 8-71.
121. Hwang RF, Gonzalez-Angulo AM, Yi M, et al. Low locoregional failure rates in selected breast cancer patients with tumor-positive sentinel lymph nodes who do not undergo completion axillary dissection. *Cancer*. 2007 Aug 15;110(4):723-30.
122. Giuliano AE, McCall L, Beitsch P, 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.

123. Giuliano AE, Hunt KK, Ballman KV, et al. Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis: a randomized clinical trial. *JAMA*. 2011 Feb 9;305(6):569-75.
124. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000 Aug 17;406(6797):747-52.
125. Mamounas EP, Tang G, Fisher B, et al. Association between the 21-gene recurrence score assay and risk of locoregional recurrence in node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer: results from NSABP B-14 and NSABP B-20. *J Clin Oncol*. 2010 Apr 1;28(10):1677-83.
126. Nemoto T, Vana J, Bedwani RN, et al. Management and survival of female breast cancer: results of a national survey by the American College of Surgeons. *Cancer*. 1980 Jun 15;45(12):2917-24.
127. Harris EE, Freilich J, Lin HY, et al. The impact of the size of nodal metastases on recurrence risk in breast cancer patients with 1-3 positive axillary nodes after mastectomy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2013 Mar 1;85(3):609-14.
128. Rubio IT, Aznar F, Lirola J, et al. Intraoperative assessment of sentinel lymph nodes after neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer. *Ann Surg Oncol*. 2010 Jan;17(1):235-9.
129. Tavassoli FA DP. Pathology and genetics. Tumors of the breast and female genital organs. World Health Organization classification of tumors. Lyon, WHO. 2001.
130. Meyer JS, Alvarez C, Milikowski C, et al. Breast carcinoma malignancy grading by Bloom-Richardson system vs proliferation index: reproducibility of grade and advantages of proliferation index. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc. [Comparative Study]*. 2005 Aug;18(8):1067-78.

131. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2010 Jul;134(7):e48-72.
132. Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, et al. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. *J Natl Cancer Inst*. 2011 Nov 16;103(22):1656-64.
133. Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol*. 2011 Feb;5(1):5-23.
134. Cheang MC, Chia SK, Voduc D, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2009 May 20;101(10):736-50.
135. Tiernan JP, Verghese ET, Nair A, et al. Systematic review and meta-analysis of cytokeratin 19-based one-step nucleic acid amplification versus histopathology for sentinel lymph node assessment in breast cancer. *Br J Surg*. 2014 Mar;101(4):298-306.
136. Schwartz GF, Giuliano AE, Veronesi U, et al. Proceedings of the consensus conference on the role of sentinel lymph node biopsy in carcinoma of the breast, April 19-22, 2001, Philadelphia, Pennsylvania. *Cancer*. 2002 May 15;94(10):2542-51.
137. Viale G, Maiorano E, Pruneri G, et al. Predicting the risk for additional axillary metastases in patients with breast carcinoma and positive sentinel lymph node biopsy. *Ann Surg*. 2005 Feb;241(2):319-25.
138. Houvenaeghel G, Nos C, Mignotte H, et al. Micrometastases in sentinel lymph node in a multicentric study: predictive factors of nonsentinel lymph node involvement--Groupe des Chirurgiens de la Federation des Centres de Lutte Contre le Cancer. *J Clin Oncol*. 2006 Apr 20;24(12):1814-22.

139. Cserni G, Gregori D, Merletti F, et al. Meta-analysis of non-sentinel node metastases associated with micrometastatic sentinel nodes in breast cancer. *Br J Surg*. 2004 Oct;91(10):1245-52.
140. Ronka R, Smitten K, Sintonen H, et al. The impact of sentinel node biopsy and axillary staging strategy on hospital costs. *Ann Oncol*. 2004 Jan;15(1):88-94.
141. Klingler S, Marchal F, Rauch 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.
142. Santaballa A, De La Cueva H, Salvador C, et al. Advantages of one step nucleic acid amplification (OSNA) whole node assay in sentinel lymph node (SLN) analysis in breast cancer. *SpringerPlus*. 2013;2:542.
143. Wahner-Roedler DL, Reynolds CA, Boughey JC. Collision tumors with synchronous presentation of breast carcinoma and lymphoproliferative disorders in the axillary nodes of patients with newly diagnosed breast cancer: a case series. *Clin Breast Cancer*. 2011 Mar;11(1):61-6.
144. Arana S, Vasquez-Del-Aguila J, Espinosa M, et al. Lymphatic mapping could not be impaired in the presence of breast carcinoma and coexisting small lymphocytic lymphoma. *The American journal of case reports*. 2013;14:322-5.
145. Dy BM, Reynolds CA, Wahner-Roedler DL, et al. Sentinel lymph node surgery for staging of breast carcinoma in patients with lymphoproliferative disease. *Am Surg*. 2010 Dec;76(12):1423-5.
146. Chu PG, Weiss LM. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology*. 2002 May;40(5):403-39.
147. Tamaki Y, Sato N, Homma K, et al. Routine clinical use of the one-step nucleic acid amplification assay for detection of sentinel lymph node

- metastases in breast cancer patients: Results of a multicenter study in Japan. *Cancer*. 2012 Jul 15;118(14):3477-83.
148. Ohi Y, Umekita Y, Sagara Y, et al. Whole sentinel lymph node analysis by a molecular assay predicts axillary node status in breast cancer. *Br J Cancer*. 2012 Oct 9;107(8):1239-43.
149. Peg V, Espinosa-Bravo M, Vieites B, et al. Intraoperative molecular analysis of total tumor load in sentinel lymph node: a new predictor of axillary status in early breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2013 May;139(1):87-93.
150. Caudle AS, Hunt KK, Kuerer HM, et al. Multidisciplinary considerations in the implementation of the findings from the American College of Surgeons Oncology Group (ACOSOG) Z0011 study: a practice-changing trial. *Ann Surg Oncol*. 2011 Sep;18(9):2407-12.
151. Yi M, Giordano SH, Meric-Bernstam F, 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.
152. Galimberti V, Cole BF, Zurrada S, et al. Axillary dissection versus no axillary dissection in patients with sentinel-node micrometastases (IBCSG 23-01): a phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2013 Apr;14(4):297-305.
153. Dengel LT, Van Zee KJ, King TA, et al. Axillary dissection can be avoided in the majority of clinically node-negative patients undergoing breast-conserving therapy. *Ann Surg Oncol*. 2014 Jan;21(1):22-7.
154. Lyman GH, Temin S, Edge SB, et al. Sentinel Lymph Node Biopsy for Patients With Early-Stage Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol*. 2014 Mar 24.
155. NCCN. (2014) National Comprehensive Cancer Network Clinical Practice Guidelines in Oncology. Breast Cancer. Version 3.2014. Available from:

http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/PDF/breast.pdf [accessed April 17, 2014].

156. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol*. 2013 Sep;24(9):2206-23.
157. Caudle AS, Hunt KK, Tucker SL, et al. American College of Surgeons Oncology Group (ACOSOG) Z0011: Impact on Surgeon Practice Patterns. *Ann Surg Oncol*. 2012 Oct;19(10):3144-51.
158. Osako T, Iwase T, Akiyama F. Reply: One-step nucleic acid amplification assay also predicts axillary lymph node status in breast cancer patients: further molecular diagnostic evidence. *Eur J Cancer*. 2013 Dec;49(18):3947-8.
159. Rutgers E, Piccart-Gebhart MJ, Bogaerts J, et al. The EORTC 10041/BIG 03-04 MINDACT trial is feasible: results of the pilot phase. *Eur J Cancer*. 2011 Dec;47(18):2742-9.
160. Gonzalez-Angulo AM, BW, Gralow J et al. SWOG S1007: a phase III, randomized clinical trial of standard adjuvant endocrine therapy with or without chemotherapy in patients with one to three positive nodes, hormone receptor (HR)-positive, and HER2-negative breast cancer with recurrence score (RS) of 25 or less. *J Clin Oncol* 2011; 29 (suppl; abstr TPS104).

8. ANEXOS

8.1 ANEXO 1: TNM

Tumor primario (pT)

- pT1: tumor menor o igual a 20 mm en su diámetro mayor;
 - pT1mi: tumor menor o igual a 1 mm en su diámetro mayor;
 - pT1a: tumor mayor a 1 mm pero menor o igual a 5 mm en su diámetro mayor;
 - pT1b: tumor mayor a 5 mm pero menor o igual a 10 mm en su diámetro mayor;
 - pT1c: tumor mayor a 10 mm pero menor o igual a 20 mm en su diámetro mayor;
- pT2: tumor mayor a 20 mm pero menor o igual a 50 mm en su diámetro mayor.
- pT3: tumor mayor a 50 mm.

Ganglios linfáticos regionales (pN)

El pN1 se definió como la presencia de micrometástasis ó metástasis en 1 a 3 ganglios linfáticos axilares, y/o en los ganglios de la cadena mamaria interna detectadas por biopsia del ganglio centinela, sin detección clínica. Se dividen a su vez en:

- pN1mi: presencia de micrometástasis (metástasis > 0,2 mm y/o más de 200 células pero no mayor a ≤ 2 mm);
- pN1a: presencia de metástasis en 1-3 ganglios axilares, incluyendo al menos una metástasis > 2,0 mm;
- pN2a: presencia de metástasis en 4-9 ganglios axilares, incluyendo al menos una metástasis > 2,0 mm;
- pN3a: presencia de metástasis en ≥ 10 ganglios axilares, incluyendo al menos una metástasis > 2,0 mm.

8.2 ANEXO 2: Tipos histológicos de la OMS.

El tipo histológico de los tumores fue determinado por el por el Servicio de Anatomía Patológica, siguiendo la clasificación actual del cáncer invasivo de mama determinando por la Organización Mundial de la Salud:

- Carcinoma Ductal Infiltrante
- Carcinoma Lobulillar Infiltrante
- Carcinoma Tubular
- Carcinoma Cribiforme Infiltrante
- Carcinoma Medular
- Carcinoma Productor de Mucina
- Tumores Neuroendócrinos
- Carcinoma Papilar Infiltrante
- Carcinoma Micropapilar Infiltrante
- Carcinoma Apócrino
- Carcinoma Metaplásico
- Carcinoma Secretor
- Carcinoma Adenoideo Quístico
- Carcinoma en Anillo de Sello
- Carcinoma Inflamatorio

8.3 ANEXO 3: Tabla de curva de predicción en la población total.

TTL	Log 10 de la Carga	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
10	1,00	100,00	0,00	28,57	
100	2,00	100,00	0,00	28,57	
500	2,70	90,00	9,33	28,12	69,99
1000	3,00	86,67	24,00	26,12	81,82
2000	3,30	80,00	32,00	24,24	80,00
3000	3,48	80,00	38,67	24,03	82,86
4000	3,60	76,67	45,33	23,03	82,93
5000	3,70	73,33	48,00	22,10	81,82
6000	3,78	73,33	50,67	22,05	82,61
7000	3,85	73,33	50,67	22,05	82,61
8000	3,90	73,33	56,00	21,95	84,00
9000	3,95	73,33	56,00	21,95	84,00
10000	4,00	73,33	60,00	21,89	84,90
15000	4,18	73,33	60,00	21,89	84,90
20000	4,30	70,00	64,00	20,94	84,21
25000	4,40	60,00	66,67	18,15	80,65
30000	4,48	53,33	69,33	16,22	78,79
35000	4,54	53,33	69,33	16,22	78,79
40000	4,60	53,33	72,00	16,19	79,41
45000	4,65	53,33	72,00	16,19	79,41
50000	4,70	53,33	72,00	16,19	79,41
60000	4,78	50,00	76,00	15,19	79,17
70000	4,85	46,67	77,33	14,21	78,38
80000	4,90	46,67	77,33	14,21	78,38
90000	4,95	46,67	80,00	14,19	78,95
100000	5,00	46,67	82,67	14,16	79,49
110000	5,04	46,67	82,67	14,16	79,49
120000	5,08	46,67	85,33	14,14	80,00
130000	5,11	46,67	85,33	14,14	80,00
140000	5,15	46,67	85,33	14,14	80,00
150000	5,18	43,33	85,33	13,17	79,01
160000	5,20	43,33	85,33	13,17	79,01
170000	5,23	43,33	85,33	13,17	79,01
180000	5,26	36,67	86,67	11,20	77,38
190000	5,28	36,67	86,67	11,20	77,38
200000	5,30	36,67	86,67	11,20	77,38
500000	5,70	33,33	88,00	10,20	76,74

8.4 ANEXO 4: Tabla de curva de predicción en la población con receptores hormonales positivos.

TTL	Log 10 de la Carga	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
100	2,00	100,00	0,00	25,25	73,40
500	2,70	90,00	9,33	25,11	73,42
1000	3,00	90,00	24,00	28,57	87,66
2000	3,30	83,33	32,00	29,28	85,04
3000	3,48	83,33	38,67	31,46	87,29
4000	3,60	80,00	44,00	32,55	86,69
5000	3,70	76,67	46,67	32,69	85,55
6000	3,78	76,67	50,67	34,43	86,54
7000	3,85	76,67	50,67	34,43	86,54
8000	3,90	76,67	54,67	36,36	87,40
9000	3,95	76,67	54,67	36,36	87,40
10000	4,00	76,67	58,67	38,52	88,16
15000	4,18	76,67	58,67	38,52	88,16
20000	4,30	73,33	61,33	39,05	87,19
25000	4,40	73,33	64,00	40,76	87,66
30000	4,48	60,00	68,00	38,78	83,42
35000	4,54	60,00	70,67	40,86	83,95
40000	4,60	60,00	70,67	40,86	83,95
45000	4,65	60,00	70,67	40,86	83,95
50000	4,70	60,00	70,67	40,86	83,95
60000	4,78	56,67	73,33	41,78	83,36
70000	4,85	53,33	76,00	42,88	82,82
80000	4,90	53,33	78,67	45,79	83,31
90000	4,95	53,33	78,67	45,79	83,31
100000	5,00	53,33	81,33	49,11	83,76
110000	5,04	53,33	81,33	49,11	83,76
120000	5,08	53,33	84,00	52,96	84,20
130000	5,11	53,33	84,00	52,96	84,20
140000	5,15	53,33	84,00	52,96	84,20
150000	5,18	53,33	84,00	52,96	84,20
160000	5,20	53,33	84,00	52,96	84,20
170000	5,23	53,33	84,00	52,96	84,20
180000	5,26	50,00	85,33	53,52	83,48
190000	5,28	50,00	85,33	53,52	83,48
200000	5,30	50,00	85,33	53,52	83,48
500000	5,70	50,00	86,67	55,89	83,69

