

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

FACULTAD DE MEDICINA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD



**ESTUDIO DE VALIDACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA METALOPROTEASA-1
COMO PREDICTOR DE LA AFECTACIÓN TUMORAL DE LOS GANGLIOS NO
CENTINELA EN EL CÁNCER DE MAMA**

TESIS DOCTORAL

M^a DESIRÉE DÍAZ GONZÁLEZ

2016



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

| | |
|---|---|
| 1.- Título de la Tesis | |
| Español: Estudio de validación de la expresión de metaloproteasa 1 (MMP-1) como predictor de la afectación tumoral de los ganglios no centinela en el cáncer de mama. | Inglés: Validation study of MMP-1 expresión as predictor of metastatic breast cancer in non-sentinel lymph nodes. |
| 2.- Autor | |
| Nombre: M ^a Desirée Díaz González | |
| Programa de Doctorado: Programa de doctorado en Ciencias de la Salud | |
| Órgano responsable: Universidad de Oviedo | |

RESUMEN (en español)

| |
|---|
| <p>OBJETIVOS:</p> <p>La afectación ganglionar continua siendo, uno de los factores pronóstico independientes más importante en el cáncer de mama (CM). La técnica de Biopsia selectiva de ganglio centinela (BSGC) se considera un estándar de tratamiento para las pacientes diagnosticadas de CM con ganglios axilares clínicamente negativos. Sin embargo, su desarrollo nos ha planteado nuevos interrogantes, tales como definir a ese importante porcentaje de pacientes que sólo presentan afectación del ganglio centinela (GC), en las que se podrá evitar una linfadenectomía axilar (LA) o cualquier otro tipo de tratamiento sobre la axila y sus efectos adversos. En un estudio previo se evidenció que la elevada expresión de metaloproteasa-1 (MMP-1) por las células mononucleares inflamatorias (CMI) del GC, puede representar un útil marcador de predicción de la afectación de ganglios no centinela (GNC), tras la identificación de un GC metastásico (Eiró N. et al., Eur J Cancer, 2012). El objetivo del presente estudio es validar los resultados en una población diferente de pacientes con CM.</p> <p>MATERIAL Y MÉTODOS:</p> <p>Se incluye en este estudio observacional analítico de casos y controles a 97 pacientes sometidas a BSGC en la fase terapéutica por CM, con GC positivos. Se realizó la inmunotinción en cortes parafinados de 5µm con un anticuerpo específico contra la MMP-1. Se consideró una expresión positiva de MMP-1 por las CMI cuando se observó un mínimo de 10% de CMI peritumorales teñidas.</p> <p>RESULTADOS:</p> <p>De las 97 pacientes incluidas en el estudio, en 53 de ellas el GC fue el único positivo y en 44 se encontraron otros ganglios afectados en la LA. En todas las pacientes en las que no existe expresión de MMP-1 (n=29), el GC fue el único afectado. De las 68 pacientes en las que sí se encontró elevada la expresión de MMP-1, en 24 de ellas éste era el único ganglio positivo y en las otras 44 se encontraron otros ganglios afectados en la LA. Por lo tanto, la sensibilidad de la prueba fue del 100%, la especificidad del 54,72% y el Valor Predictivo Negativo del 100%.</p> <p>CONCLUSIONES:</p> <p>Los resultados de nuestro trabajo reproducen los obtenidos en el estudio previo publicado por Eiró N et al, por lo tanto, a la vista de ello, podemos concluir que la expresión de MMP-1 por las CMI en los GC positivos predice de forma significativa el estado de los GNC en el CM. Es de destacar que ninguno de los casos sin expresión de MMP-1 presenta GNC metastásicos. Por tanto, en las pacientes con GC positivo en las que no se expresa la MMP-1, no sería necesario realizar ningún tratamiento adicional sobre la axila, evitando la morbilidad que ello conlleva.</p> |
|---|



RESUMEN (en Inglés)

OBJETIVE:

Nodal tumor involvement remains one of the most important independent prognosis factors in Breast Cancer (BC). The technique of sentinel lymph node biopsy is considered as a standard treatment for patients with a diagnosis of Breast Cancer (BC) and clinically negative axilla. However its development has raised new challenges such as isolate the important rate that only present involvement of the sentinel node (SLN), in which it could be abolished axillary lymphadenectomy (AL) or any other axillar treatment and its side effects. A previous study evidenced that a high metalloprotease-1 (MMP-1) expression in mononuclear inflammatory cells (MICs) of the SLN can represent a useful predictor marker for the affection of the non sentinel nodes (NSLNs) following the identification of a metastatic SLN. The aim of this study is validate the results in a different group of patients with BC.

PATIENTS AND METHODS:

A total of 97 patients were included in an observational case-control study. All of them had a SLNB during the treatment of a BC with a positive SN. Immunostaining was performed in 5µm paraffinated slides with a specific antibody against MMP-1. MMP-1 positive expression was considered with a minimum of 10% of peritumoral CMI's stained.

RESULTS:

Among the 97 patients included in the study, in 53 of them the SLN was the only positive node and in other 44 more nodes were affected in the AL. In all the patients without MMP-1 expression (n=29) the SLN was the only affected. Among the 68 patients with a high MMP-1 expression, in 24 of them the SLN was the only positive node and in the other 44 more nodes were affected in the AL. Therefore sensitivity of the test was 100%, specificity was 54,72% and negative predictive value was 100%.

CONCLUSIONS:

We can conclude that the MMP-1 expression in MICs in positive SLN predicts significantly the status of the NSLNs in BC. It is remarkable that none of the cases without MMP-1 expression presented metastatic NSLNs. Therefore, in patients with positive SLN without MMP-1 expression would not be necessary any further axillary treatment, abolishing associated morbidity.

A David, David jr y María
Por hacer mi vida tan feliz

AGRADECIMIENTOS

- * Al Dr. Francisco José Vizoso, Jefe de la Unidad de Investigación del Hospital de Jove y Director de esta tesis, porque sin su ayuda este trabajo nunca hubiera sido posible.
- * Al Dr. José Ignacio Rodríguez, Co-Director de esta tesis, porque siempre que lo necesité estuvo ahí.
- * A la Dra. Noemí Eiró, a la que no tengo palabras para agradecer todo lo que me ha ayudado en este largo camino.
- * Al Dr. Radhamés Hernández por estar siempre disponible para cualquier duda y ayudarme de forma inestimable al principio del camino.
- * Al Dr. Francisco Domínguez, porque gracias a él he conseguido gran parte del material necesario para elaborar esta tesis.
- * Al Dr. Luis Ovidio por enseñarme a manejar un microscopio.
- * A la Dra. Isabel Blanco, pilar fundamental en la implantación de la técnica del ganglio centinela en el Hospital de Cabueñes. Gracias por ayudarme a incluir algo de investigación en mi actividad profesional.
- * A la Dra. Luzdivina Santamaría, por su dedicación a la Unidad de mama y porque trabajar con ella es una de las mejores cosas que me han pasado en la vida.
- * Al Dr. Germán Juan porque fue quien me empujó a empezar esta tesis.
- * Al resto de los miembros de la Unidad de mama del Hospital de Cabueñes, porque me han enseñado lo que es trabajar de forma multidisciplinar y porque son unos grandes profesionales de los que aprendo todos los días.
- * A la Dra. Díaz Solis, por su ayuda con el inglés.
- * A mis padres y mis suegros porque siempre están ahí cuando los necesito. Y en estos últimos meses los he necesitado muy a menudo.
- * A David, María y David jr, por tener paciencia y perdonarme el tiempo que no he pasado con ellos.

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 14 |
| 1.1 EPIDEMOLOGÍA | 17 |
| 1.2 FACTORES DE RIESGO | 18 |
| 1.3 FACTORES PRONÓSTICO Y PREDICTIVOS | 23 |
| 1.4 CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA DE LOS TUMORES DE MAMA | 33 |
| 1.5 CLASIFICACIÓN TNM DEL CÁNCER DE MAMA | 38 |
| 1.6 CLASIFICACIÓN MOLECULAR DEL CÁNCER DE MAMA | 43 |
| 1.7 TRATAMIENTO QUIRÚRGICO DEL CÁNCER DE MAMA | 47 |
| 1.8 BIOPSIA DE GANGLIO CENTINELA | 50 |
| 1.9 METALOPROTEASAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR | 68 |
| 1.10 FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN Pit-/POU1F1 | 72 |
| 2. JUSTIFICACIÓN | 74 |
| 3. OBJETIVOS | 76 |
| 4. MATERIAL Y MÉTODOS | 78 |
| 4.1 DISEÑO DEL ESTUDIO | 79 |
| 4.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO | 79 |
| 4.3 PROCEDIMIENTO DE BIOPSIA DE GANGLIO CENTINELA Y SU ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO | 82 |
| 4.4 MANEJO DE LAS MUESTRAS-TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA | 84 |
| 4.5 ANÁLISIS DE LAS TINCIONES | 84 |
| 4.6 ANÁLISIS DE DATOS Y MÉTODOS ESTADÍSTICOS | 86 |

| | |
|---|------------|
| 5. RESULTADOS | 87 |
| 5.1 TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA PARA LA MMP-1 EN LOS GANGLIOS CENTINELA METASTÁSICOS | 88 |
| 5.2 RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE MMP-1 EN LOS GANGLIOS CENTINELA Y LA AFECTACIÓN NEOPLÁSICA DE LOS GANGLIOS NO CENTINELA | 89 |
| 5.3 SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD, VALOR PREDICTIVO NEGATIVO Y POSITIVO DE LA EXPRESIÓN DE MMP-1 EN EL GANGLIO CENTINELA METASTÁSICO PARA PREDECIR LA AFECTACIÓN DE LOS GANGLIOS NO CENTINELA | 89 |
| 5.4 RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE MMP-1 EN EL GANGLIO CENTINELA METASTÁSICO Y LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLOGICAS DE LOS PACIENTES Y DE SUS TUMORES | 90 |
| 5.5 ANÁLISIS DE LAS POSIBLES COMBINACIONES ENTRE LA EXPRESIÓN DE MMP-1 EN LOS GANGLIOS CENTINELA METASTÁSICOS Y LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE LOS PACIENTES DE CARA A MEJORAR LA PREDICCIÓN DE AFECTACIÓN DE LOS GANGLIOS NO CENTINELA | 93 |
| 5.6 TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA PARA PIT-1 POR LOS GANGLIOS CENTINELA METASTÁSICOS | 98 |
| 5.7 ANÁLISIS DE LOS VALORES DE TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA PARA PIT-1 EN LOS GANGLIOS CENTINELA METASTÁSICOS | 99 |
| 5.8 RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE PIT-1 EN LOS GANGLIOS CENTINELA METASTÁSICOS Y LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE LOS PACIENTES Y DE SUS TUMORES | 101 |
| 5.9 RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE PIT-1 EN LOS GANGLIOS CENTINELA METASTÁSICOS Y LA AFECTACIÓN DE LOS GANGLIOS NO CENTINELA | 104 |
| 5.10 RELACIÓN ENTRE LAS EXPRESIONES DE MMP-1 Y PIT1 EN LOS GANGLIOS CENTINELA METASTÁSICOS | 106 |
| 6. DISCUSIÓN | 109 |
| 7. CONCLUSIONES | 119 |
| 8. BIBLIOGRAFÍA | 121 |

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama (CM) es la primera causa de muerte por cáncer en la mujer en los países industrializados. Se calcula que una de cada 8-10 mujeres presentará cáncer de mama a lo largo de su vida (1). Por ello esta enfermedad, constituye un problema de salud prioritario para las Administraciones Sanitarias.

Hoy en día gracias a los avances de las tecnologías de análisis genómico, podemos clasificar el cáncer de mama de una manera más adecuada en lo que se refiere a pronóstico y efectividad del tratamiento (2). Sin embargo las características clínicas e histológicas de estos tumores siguen siendo elementos importantes para definir la supervivencia y el tratamiento de la enfermedad. De hecho, la afectación ganglionar metastásica continúa siendo a día de hoy el factor pronóstico independiente más importante en el cáncer de mama (3). Por ello, cuando la lesión se encuentra localizada únicamente en la mama, sin afectación ganglionar, la supervivencia a los 10 años alcanza el 85%, mientras que cuando los ganglios están afectados, ésta desciende al 40% (4).

Para definir el pronóstico de una paciente con cáncer de mama, es fundamental determinar si existe o no afectación ganglionar a nivel de la axila, lo que nos permite estadiar el tumor y elegir el tratamiento más adecuado para cada caso.

Hasta hace unos años la única manera de determinar si existía afectación ganglionar, era realizando una linfadenectomía axilar. Esto ha cambiado actualmente, gracias a la técnica de biopsia selectiva de ganglio centinela (BSGC). Sin embargo, cuando en el ganglio centinela (GC) se detectan macrometástasis, en la mayoría de los centros se realiza un vaciamiento axilar, para determinar el estado de los ganglios restantes, algo que a día de hoy está muy discutido, ya que se ha evidenciado que una vez realizado el vaciamiento, en el 50-68% de los casos según las series, el GC es el único ganglio positivo (5), por lo que en estas pacientes la linfadenectomía no habría sido necesaria.

En las guías internacionales publicadas más recientemente (6) ya se comienza a valorar la posibilidad de no realizar una linfadenectomía completa en las pacientes que tienen 1 ó 2 ganglios centinela positivos, en las que se ha realizado cirugía conservadora y se

va a administrar tratamiento radioterápico. Sin embargo, éste es un tema que despierta mucha controversia.

Parece por tanto necesario, investigar nuevas estrategias que nos ayuden a definir que pacientes con GC positivo podrían beneficiarse de no recibir ningún tratamiento complementario (ni quirúrgico ni radioterápico) a nivel axilar, evitando así la morbilidad que ello conlleva.

1.1 EPIDEMIOLOGÍA

El cáncer de mama es el tumor más frecuente en las mujeres a nivel mundial. Se estima que en 2012 se diagnosticaron 1.676.633 de casos nuevos en el mundo, causando alrededor de medio millón de muertes (7).

La tasa de incidencia anual dentro de los países europeos varía entre 60-90 casos por cada 100.000 mujeres/año en los países nórdicos y occidentales, y entre 30-60 casos por cada 100.000 mujeres/año en los del este y mediterráneos.

En España se ha incrementado en los últimos años, diagnosticándose alrededor de 26.000 nuevos casos de cáncer de mama al año, falleciendo más de 6.000 mujeres por esta causa (8).

Aunque la incidencia y mortalidad ha ido incrementándose a lo largo de este siglo en todos los países, en las últimas estadísticas internacionales publicadas se aprecia una disminución de la mortalidad, que se debería, probablemente, a un diagnóstico precoz mediante los programas de cribado y a los avances terapéuticos (9).

La mayoría de los casos se diagnostican entre los 35 y los 80 años, con una máxima incidencia entre los 45 y los 65 años.

1.2 FACTORES DE RIESGO

El riesgo de padecer cáncer de mama está relacionado con factores ambientales y de estilo de vida, algo que se ha justificado por la variación geográfica que existe en la incidencia y mortalidad. También hay que destacar el hecho de que las cifras de incidencia se igualen en las poblaciones emigrantes en una o dos generaciones, lo que habla a favor de que los factores culturales, dietéticos y ambientales son muy importantes, más que los étnicos, de raza u origen.

Aunque parece claro que la etiología del cáncer de mama es probablemente multifactorial, es importante destacar, desde el punto de vista preventivo, los factores de riesgo que aumentan la posibilidad de padecer esta enfermedad.

1.2.1 FACTORES DE RIESGO PRINCIPALES

- SEXO: EL 99% de los cánceres de mama se presentan en mujeres.
- EDAD: Es el factor de riesgo más importante después del sexo, aumentando progresivamente su incidencia con la edad. La mayoría de los cánceres se desarrollan por encima de los 40 años y, únicamente, el 1,5% antes de los 30 años. En la premenopausia, la frecuencia aumenta progresivamente hasta alcanzar una meseta entre los 45-55 años. Después de la menopausia la frecuencia se incrementa pero menos rápidamente.
- ANTECEDENTES FAMILIARES: Las mujeres con familiares que han presentado cáncer de mama (fundamentalmente de primer grado y bilateral) tienen mayor riesgo de sufrir la enfermedad que el resto de la población general. En su mayor parte este aumento de riesgo es atribuible a factores ambientales compartidos. Teniendo en cuenta esos antecedentes familiares podríamos clasificar los cánceres de mama en:
 - Esporádicos: Sin antecedentes en dos o más generaciones (el más frecuente)
 - Familiar: Varios miembros de la familia con parentesco de primer y segundo grado sufren la enfermedad. Se presenta en el 15-25% de los

casos y se cree que se debe a factores ambientales y sociales, al azar o por factores genéticos desconocidos.

- **Hereditario:** Es el menos frecuente. Representa entre el 5-10% de todos los casos. Se conoce como cáncer familiar y su origen reside frecuentemente en la mutación de uno de los dos genes identificados hasta el momento, BRCA 1 (localizado en el cromosoma 17q2-21) y BRCA 2 (localizado en el cromosoma 13q12-13). La presencia de estas mutaciones es suficiente para que los individuos portadores presenten una susceptibilidad muy alta para desarrollar cáncer de mama y otros tumores relacionados, como cáncer de ovario o próstata. Esto da lugar a un patrón en el que el cáncer aparece como un carácter que se hereda de forma autosómica dominante. Además se observan otras características, como la aparición del tumor a edades tempranas o la presencia de bilateralidad en caso de que el cáncer afecte a órganos pares.

Inicialmente se pensó que estos dos genes explicarían casi el 100% de los casos de cáncer de mama y/o ovario familiar, pero se ha visto que tan sólo un 25% son atribuibles a mutaciones en estos dos genes (10). Por ello, la identificación de nuevos genes de susceptibilidad es muy importante para ofrecer un mejor y más acertado consejo genético a las familias.

Otras alteraciones genéticas asociadas con el cáncer de mama hereditario, en un porcentaje inferior al 1% son las relacionadas con los Síndromes de Li-Fraumeni, Síndrome de Peutz-Jeghers, Enfermedad de Cowden, Síndrome de Muir-Torre y el Síndrome de Louis-Barr.

- **ANTECEDENTES PERSONALES DE CÁNCER DE MAMA:** Cuando una mujer ha tenido ya un cáncer de mama el riesgo de tener otro contralateral aumenta 5 veces más que en el resto de la población.

También se han relacionado los antecedentes de cáncer de ovario, endometrio, próstata y colon, con el aumento de riesgo de cáncer de mama.

- ANTECEDENTES DE ENFERMEDADES PROLIFERATIVAS DE LA MAMA: El diagnóstico histológico de hiperplasia epitelial típica tiene un escaso riesgo de desarrollar cáncer (RR 1-2). El riesgo se incrementa considerablemente cuando el diagnóstico es de hiperplasia epitelial atípica (RR 4,24) (11), este riesgo es para ambas mamas y no sólo para la zona operada.
- MENARQUIA PRECOZ (< 12 años) Y MENOPAUSIA TARDÍA (> 50 años) (12). Son dos claros factores de riesgo, debido a que condicionan una mayor exposición temporal del tejido mamario a los estrógenos ováricos.
- PARIDAD Y EDAD DEL PRIMER EMBARAZO: La nuliparidad también va asociada a un mayor riesgo, mientras que la esterilidad pudiera representar un factor protector. En cuanto al número de hijos, no está claro que sea un factor de protección, pero de serlo, sería con más de 4-5 hijos.

Algunos autores consideran que el riesgo de cáncer de mama en las mujeres que tienen su primer hijo después de los 30 años es el doble que en aquellas que lo tienen antes de los 20 años (13). El embarazo actuaría mediante múltiples cambios hormonales induciendo a una diferenciación y resistencia del tejido mamario a la transformación neoplásica.

1.2.2 OTROS FACTORES DE RIESGO RELEVANTES

- FACTORES ÉTNICOS Y RACIALES: Determinadas razas, entre ellas la judía, tienen mayor riesgo de padecer cáncer de mama, independientemente de otros factores. También parece observarse que, en el mismo hábitat, las mujeres de raza blanca tienen mayor riesgo que las de raza negra.
- LACTANCIA MATERNA: Diferentes estudios sugieren que la lactancia materna reduce el riesgo de padecer cáncer de mama (14), a mayor duración menor riesgo.

Un metaanálisis publicado en The Lancet (15) indicó que el riesgo de cáncer de mama disminuye un 4,3% ($p < 0,001$) por cada año de lactancia. Esta reducción del riesgo existe independientemente del número de hijos.

- TRATAMIENTOS HORMONALES
 - Anticonceptivos hormonales: No existen estudios que demuestren un mayor riesgo de cáncer de mama por el consumo de anticonceptivos orales. No obstante, es aconsejable que las mujeres con antecedentes familiares o hereditarios no tomen anovulatorios.
 - La terapia hormonal sustitutiva con estrógenos en la menopausia incrementaría el riesgo de padecer cáncer de mama, pero fundamentalmente en relación con la duración del tratamiento. No obstante, su uso estaría justificado al disminuir la morbilidad y mortalidad por osteoporosis y cardiopatías (16).
- RADIACIONES IONIZANTES: Su efecto es directamente proporcional a la dosis e inversamente proporcional a la edad, permaneciendo de por vida. Parece que las consecuencias son especialmente nefastas cuando la radiación se produjo en la infancia y adolescencia. Sin embargo, el hecho de realizar una mamografía anual supone un riesgo muy escaso.
- HÁBITOS Y FACTORES DIETÉTICOS (17):
 - Alcohol: Parece que hay un cierto riesgo proporcional a su consumo. Cuando hay un excesivo consumo el riesgo se puede elevar a 2,2 de RR.
 - El tabaco se relaciona con un incremento en el riesgo de padecer cáncer de mama.
 - La práctica de ejercicio físico moderado y continuo parece que reduce el riesgo.
 - El sobrepeso parece jugar un papel diferente en función del estado menopaúsico. Las mujeres menopaúsicas con sobrepeso presentan mayor riesgo de cáncer de mama que las mujeres no menopaúsicas
 - El estrés intenso puede actuar como desencadenante al disminuir la inmunidad.
 - Una dieta rica en grasas animales aumentaría el riesgo y el mayor consumo de frutas y verduras lo disminuiría. El hecho de que el cáncer de mama esté aumentando en los países anglosajones y en los

estamentos altos de la sociedad, hace pensar que la forma de vida asociada a algunas costumbres dietéticas pueden ser factores fundamentales para determinadas mujeres, aunque los datos no son concluyentes.

- XENOESTRÓGENOS ORGANOCOLORADOS, PARABENES Y SALES DE ALUMINIO: Se relacionan con un incremento en la incidencia de cáncer de mama, aunque los resultados de los estudios realizados son contradictorios, por lo que son necesarios estudios complementarios (18)

1.3 FACTORES PRONÓSTICOS Y PREDICTIVOS

Los Factores Pronósticos son variables de tipo clínico, histológico, biológico o molecular, que nos informan sobre la historia natural y la evolución de la enfermedad sin tratamiento. Por el contrario, los factores Predictivos de respuesta, nos informan sobre la probabilidad de respuesta o resistencia tumoral a un tratamiento determinado. Existen algunos factores predictivos que podrían ser considerados como pronósticos, ya que su expresión también determina en alguna medida la agresividad biológica del tumor.

El conocer estos factores pronósticos nos permite seleccionar a pacientes que se beneficiarían de tratamientos complementarios e identificar a aquellas con muy mal pronóstico, en las que esté indicado utilizar tratamientos más agresivos (19)

Para que un factor pronóstico se considere útil, debe tener un valor predictivo significativo e independiente, validado en ensayos clínicos. Su determinación ha de ser sencilla, reproducible y asequible en la mayoría de los pacientes y disponer de controles de calidad que garanticen su valor. Además, debe ser fácilmente interpretable por el clínico y tener implicaciones terapéuticas (20).

1.3.1 FACTORES CLÍNICOS

1.3.1.1 Edad: Las pacientes menores de 35 años tienen un pronóstico peor que las de mayor edad (21). Biológicamente, este pronóstico desfavorable se explica por la existencia de un número más elevado de tumores pobremente diferenciados y con una fracción de proliferación mayor. Clásicamente, en el análisis multivariante, siempre se ha confirmado la edad como indicador pronóstico desfavorable independiente, aunque en estudios más recientes que incluyen clasificaciones con firmas genéticas, pierde esta capacidad independiente (22). Pese a ello, en la práctica clínica se sigue considerando la edad como variable pronóstica, para evaluar el riesgo de recaída y la necesidad o no de un tratamiento adyuvante.

1.3.2 FACTORES ANATOMOPATOLÓGICOS

1.3.2.1 Estado de los ganglios axilares: La presencia de metástasis en los ganglios axilares es el factor pronóstico independiente más importante en el cáncer de mama. En las pacientes en las que no existe invasión ganglionar en el momento del diagnóstico, la probabilidad de supervivencia a los 10 años de la cirugía, se sitúa en torno al 90%, mientras que cuando sí la hay, el riesgo de muerte se multiplica por un factor de 4 a 8 (23).

El número de ganglios también es un factor pronóstico, a mayor número de ganglios positivos, peor supervivencia. Hay estudios que muestran, que cuando encontramos 4 ó menos ganglios afectados, las tasas de supervivencia global a los 5 años se sitúan en torno al 80%, mientras que si son más de 4, descienden al 57%. Y puede ser inferior al 20% a los 10 años si son más de 10 (24). Aunque en los últimos años estos resultados han ido mejorando gracias al empleo de mejores esquemas de quimioterapia y de radioterapia asociados (25).

Actualmente pocas pacientes al ser diagnosticadas de un CM presentan afectación ganglionar voluminosa, lo que ha permitido que la estadificación axilar pueda realizarse mediante la técnica de BSGC.

Diferentes estudios han determinado, que el GC se encuentra afectado en el 20% de los casos (26). La supervivencia de las pacientes en las que éste es el único ganglio afectado se acerca al 90%, e incluso supera el 95% si la afectación es en forma de micrometástasis (tamaño entre 0,2 y 2 mm).

1.3.2.2 Tamaño del tumor: El tamaño tumoral se define como el diámetro máximo del tumor expresado en milímetros y se considera uno de los principales factores pronóstico, independientemente de la afectación ganglionar (27).

Aunque ambos parámetros (tamaño tumoral y estado de los ganglios) están fuertemente relacionados, los resultados obtenidos por el Instituto Nacional del Cáncer en Estados Unidos (28) concluyen que el tamaño del tumor es un factor pronóstico independiente, siendo la influencia mayor en las pacientes con ganglios positivos que negativos, pero significativa en los dos grupos. De modo que a medida que aumenta el tamaño tumoral disminuye la supervivencia.

1.3.2.3 Tipo histológico: Aunque no todos los autores consideran el tipo histológico como un factor pronóstico independiente (29), otros investigadores defienden su valor.

Las variedades histológicas más habituales son el carcinoma ductal (NST), que representa el 80% de todos los cánceres de mama diagnosticados, y el carcinoma lobulillar (15%). El pronóstico de ambos es similar, pero existen otras variedades menos frecuentes, que son de buen pronóstico, como los tipos tubular, adenoide quístico, medular, apocrino y cribiforme. Aunque también existen otras más agresivas, como el pleomórfico, el metaplásico, el micropapilar invasivo y el neuroendocrino de alto grado (30).

1.3.3 FACTORES RELACIONADOS CON LA BIOLOGÍA DEL TUMOR

1.3.3.1 Grado de diferenciación tumoral: Es un factor pronóstico independiente del tamaño y del estado de los ganglios axilares. Para valorar el grado histológico el sistema más utilizado es la clasificación histopronóstica de Scarf-Bloom-Richardson (31), en ésta, teniendo en cuenta tres parámetros anatómo-patológicos, que son la formación tubular, el pleomorfismo nuclear y el número de mitosis (a cada uno de ellos se le asigna una puntuación de 1 a 3), se establecen tres grados de malignidad:

GRADO I (3, 4 y 5): Tumor bien diferenciado, con baja malignidad. Son tumores con tendencia a la formación de túbulos, relativa uniformidad nuclear y escaso número de mitosis.

GRADO II (6 y 7): Tumor moderadamente diferenciado, con malignidad intermedia. Corresponde a tumores con menor tendencia a formar túbulos, con variación en la forma, tamaño, tinción de núcleos y nucléolos, y con mayor número de mitosis.

GRADO III (8 y 9): Tumor pobremente diferenciado, con alta malignidad. Son tumores con escasa tendencia a formar túbulos, gran pleomorfismo nuclear y elevado número de mitosis.

Diferentes estudios han demostrado que en pacientes con axila negativa, la supervivencia es significativamente mayor en aquellas con tumores grado I, que en las que tiene tumores grado II y III ($p < 0,0001$) (32)

1.3.3.2 Invasión linfática y vascular: La presencia de invasión vascular en forma de pequeños émbolos tumorales vasculares o linfáticos en el tejido mamario normal adyacente al tumor, se asocia con mayor riesgo de desarrollar metástasis ganglionares. Y se presenta en varios estudios como un factor pronóstico independiente que se correlaciona con el tiempo libre de enfermedad y la supervivencia (33).

1.3.3.3 Receptores hormonales: La expresión de receptores hormonales, receptores de estrógenos (RE) y de progesterona (RP), en el cáncer de mama se considera un importante factor pronóstico y fundamentalmente predictivo, de respuesta a la hormonoterapia (34). Así, las pacientes con alta expresión de RE y RP, tienen mayor probabilidad de respuesta a dicho tratamiento, mayor tiempo libre de enfermedad y mejor pronóstico, que las pacientes con receptores negativos (35).

Además de lo dicho anteriormente, los tumores RE positivos, suelen asociarse a otros indicadores de pronóstico favorable, como el bajo grado histológico, grado nuclear favorable y bajo índice proliferativo.

Su determinación se realiza habitualmente mediante técnicas de IHQ, a raíz de que sucesivas publicaciones hayan avalado su sensibilidad, especificidad y reproducibilidad (36), aunque siempre debemos tener en cuenta la subjetividad en la interpretación de los resultados, los diferentes puntos de corte usados para definir su positividad y la diferente sensibilidad y especificidad de los anticuerpos empleados.

El 70-80% de los carcinomas muestran positividad para receptores de estrógenos, siendo negativos en los carcinomas apocrinos, medulares, metaplásicos y en más del 90% de los carcinomas poco diferenciados (37).

1.3.3.4 Expresión del oncogén c-erb-B2 (proteína HER-2neu o Her-2): Este oncogén se localiza en el brazo largo del cromosoma 17, pertenece a la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y codifica una proteína-receptor tirosín quinasa transmembrana (Her2-neu).

Se ha detectado, que alrededor de un 17-20% de los cánceres de mama tienen amplificado y/o sobreexpresado el protooncogén c-erb-B2, lo que se asocia a una enfermedad más agresiva y a una menor supervivencia (38).

Se considera que está sobreexpresado si se observa positividad (3+) en la determinación por inmunohistoquímica de la expresión de la proteína Her2-neu en las células tumorales. En casos de menor positividad (2+), se realiza la técnica de hibridación in situ fluorescente (FISH), que muestra amplificación de las copias del gen c-erb-B2 en las células tumorales, aunque actualmente el método más utilizado en los casos dudosos es la hibridación "in situ" cromogénica (CISH), que se ha validado comparativamente con FISH e inmunohistoquímica. Para

garantizar la uniformidad en su evaluación y su reproducibilidad se han establecido una serie de recomendaciones publicadas por la Sociedad Americana de Oncología y la Sociedad Española de Anatomía Patológica y de Oncología Médica (39).

El valor fundamental de Her-2, sería como factor predictivo de respuesta a tratamientos que tienen Her-2 como diana, tales como Trastuzumab o Lapatinib. El pronóstico de la enfermedad en estas pacientes ha mejorado sustancialmente desde que estos fármacos se han incorporado al tratamiento adyuvante estándar (40).

1.3.3.5 KI-67: Se trata de un anticuerpo monoclonal que reacciona con un antígeno nuclear, que sólo se detecta en las células en proliferación. Su síntesis se inicia en la fase G1 del ciclo celular y adquiere su máxima expresión al final de la fase S.

Aunque existen resultados contradictorios respecto a esta variable, estudios recientes publicados, ponen de manifiesto un mayor riesgo de recaída en pacientes con tumores con receptores hormonales positivos y una expresión de Ki67>14% (41). Por lo tanto, podemos decir que un valor de Ki67 alto, indica que existe una elevada actividad proliferativa y se interpreta como parámetro de mal pronóstico.

1.3.3.6 Otros factores relacionados con la biología del tumor: La expresión de factor activador de plasminógeno, P53, Bcl2, ciclina E o la Catepsina D son otros factores pronóstico a los que aún no se les asigna un papel claramente establecido. Cuando se analizan de forma individual distinguen poblaciones con distinta supervivencia, pero aportan poca información adicional cuando se combinan con otros parámetros de más peso, como son la afectación ganglionar, el tamaño tumoral y el grado de diferenciación.

1.3.4 ÍNDICES PRONÓSTICO

Como hemos visto, el número de parámetros con valor pronóstico en el cáncer de mama es elevado, aunque los más importantes son el estado ganglionar, el tamaño del tumor y el grado histológico. Teniendo en cuenta estos factores, junto con la expresión de receptores hormonales y Her-2, es posible establecer una recomendación para la administración de un tratamiento adyuvante a cada paciente.

Sin embargo, existen situaciones en las que el beneficio de administrar una quimioterapia podría ser cuestionable, al existir dudas sobre su eficacia. Para ayudar a tomar determinadas decisiones, se han creado índices pronóstico a modo de calculadoras que combinan estos factores pronóstico, para ofrecer una estimación del riesgo de recaída.

Uno de éstos es el índice de Nottingham (NPI), que está basado en el tamaño del tumor, el grado histológico y el estado de los ganglios linfáticos, según la siguiente fórmula:

$$\text{NPI: } 0,2 \times \text{Tamaño tumoral (cm)} + \text{estadio de los ganglios (1,2,3)} + \text{grado tumoral (1,2,3)}$$

El valor más bajo el NPI tiene el mejor pronóstico.

Su importancia se mantiene vigente, siendo un factor pronóstico de gran trascendencia, ligado a la supervivencia libre de enfermedad y a la supervivencia global (42).

Otro muy utilizado es el *Adjuvant! Online*, una aplicación disponible en Internet, de acceso gratuito. Introduciendo la información referente a la edad, el tamaño tumoral, el número de ganglios afectados, el grado de diferenciación y la expresión de receptores, el programa estima la probabilidad de recaída y de supervivencia con y sin tratamiento adyuvante, distinguiendo según el tipo de quimioterapia y terapia endocrina ofrecida. Cuando el riesgo de recaída no alcanza el 5%, en general no se recomienda la administración de quimioterapia adyuvante (43).

1.3.5 PERFILES GÉNICOS PRONÓSTICO

La mayoría de los tumores de mama actualmente se diagnostican en estadios iniciales. Aproximadamente en el 80% de los casos tienen menos de 2 cm, con uno o ningún ganglio axilar afectado. Esto significa que la población de pacientes se ha ido homogeneizando respecto a estos factores, por lo que se hace necesario recurrir a otros parámetros si se desea afinar en el pronóstico. Los factores biológicos simples, como la expresión de receptores hormonales, sirven de cierta ayuda, pero no son suficientemente discriminativos para decidir sobre la necesidad de administrar quimioterapia adyuvante. Por ello, en los últimos años la investigación en genética y cáncer de mama, ha propiciado la aparición de herramientas complejas que analizan la expresión simultánea de múltiples genes. Estas herramientas se conocen como perfiles génicos y suelen determinarse mediante técnicas de análisis molecular de alto rendimiento como las matrices (microarrays) de ADN o la PCR (reacción en cadena de la polimerasa)(23).

Estos perfiles génicos se han desarrollado para el grupo mayoritario de cánceres de mama de hasta 5 cm de tamaño, receptores hormonales positivos y Her-2 negativo (44). Grupo en el cual el valor de la quimioterapia adyuvante puede estar discutido.

En nuestro medio están disponibles 3 plataformas: MammaPrint[®], Oncotype DX[®] y EndoPredict[®], todos útiles en enfermedad con hasta 3 ganglios axilares afectados.

1.3.5.1. MammaPrint[®] incluye 70 genes (22). Originariamente se desarrolló mediante matrices de ADN, por lo que requería material congelado, pero actualmente puede realizarse a partir de material conservado en parafina. Ofrece un resultado dicotómico: alto o bajo riesgo de recaída a distancia. En el grupo de bajo riesgo, las pacientes tienen un riesgo de recaída a distancia inferior al 10%, a pesar de no recibir quimioterapia adyuvante, con lo cual se admite que pueden prescindir de dicho tratamiento.

Estudios recientes consideran que MammaPrint® podría ser un mejor predictor pronóstico de recidiva a distancia que otras características tumorales o sistemas pronósticos de base clínica clásicamente empleados (45).

1.3.5.2 Oncotype DX® incluye 21 genes y se realiza mediante PCR a partir de material conservado en parafina. Permite obtener unas razones de riesgo de recaída estructuradas como una variable continua. No obstante, las pacientes se categorizan en 3 grupos de riesgo: alto, intermedio y bajo (46). Esta plataforma también se desarrolló en tumores sensibles a hormonas con y sin afectación ganglionar axilar. Todas las pacientes recibían terapia hormonal con tamoxifeno y como en el caso anterior la quimioterapia se evita cuando el índice de riesgo es bajo, sin embargo en el grupo intermedio no parece haberse demostrado un beneficio al añadir quimioterapia al tratamiento endocrino.

El estudio TAILORx aleatorizó a las pacientes con un riesgo de recaída intermedio a recibir, únicamente hormonoterapia o ésta y quimioterapia. Resultados recientemente publicados concluyen que en las pacientes con receptores hormonales positivos, Her-2 negativas, y ganglios axilares negativos, en las que las que se plantearía tratamiento quimioterápico adyuvante, por las características clínico-patológicas de los tumores, se podría evitar dicho tratamiento y plantear sólo hormonoterapia en aquellos casos con una expresión génica favorable (47).

En la actualidad se considera que este test es el que posee la mayor validación biológica, y su uso está incluido en la mayor parte de las guías internacionales.

1.3.5.3 EndoPredict® cuenta con 8 genes y se realiza mediante PCR a partir de material conservado en parafina. Esta plataforma aporta un resultado dicotómico (buen o mal pronóstico). A pesar de tener un precio más

económico que las anteriores, cuenta con una menor validación, aunque estudios publicados recientemente, consideran que esta plataforma podría ayudar a identificar a pacientes que no reciben tratamiento suficiente con un taxano estándar y/o antraciclinas y podrían ser elegidas para estrategias de tratamiento con nuevos fármacos (48).

1.3.5.4 PAM50 –based Prosigna® Breast Cancer Assay, es una nueva plataforma que se ha comenzado a comercializar recientemente. Combina un perfil de 50 genes para la determinación del subtipo y el tamaño tumoral, creando un índice de recaída similar al de OncotypeDX®. Varios estudios ya han demostrado su utilidad para predecir el riesgo de recaída a distancia en pacientes tratadas de cáncer de mama con receptores hormonales positivos en estadios iniciales, que reciben tratamiento endocrino durante 5 años (49)

1.4 CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA DE LOS TUMORES DE MAMA (OMS 2012) (50)

1.4.1 TUMORES EPITELIALES

1.4.1.1 Carcinoma invasivo de mama:

- Carcinoma invasivo no especificado en otra parte (NST):
 - . Carcinoma pleomórfico
 - . Carcinoma con células osteoclasticas gigantes
 - . Carcinoma con características coriocarcinomas
 - . Carcinoma con características melanóticas
- Carcinoma lobulillar invasivo:
 - . Carcinoma lobulillar clásico
 - . Carcinoma lobulillar sólido
 - . Carcinoma lobulillar alveolar
 - . Carcinoma lobulillar pleomórfico
 - . Carcinoma Túbulo-lobulillar
 - . Carcinoma lobulillar mixto
- Carcinoma tubular
- Carcinoma cribiforme
- Carcinoma con características medulares:
 - . Carcinoma medular
 - . Carcinoma medular atípico
 - . Carcinoma invasivo NST con características medulares
- Carcinoma con diferenciación apocrina
- Carcinoma con diferenciación de células en anillo de sello
- Carcinoma invasivo micropapilar
- Carcinomas metaplásicos:
 - . Carcinoma adenoescamoso de bajo grado
 - . Adenocarcinoma con metaplasia de células fusiformes
 - . Carcinoma de células escamosas

- . Carcinoma de células en huso
- . Carcinoma metaplásico con diferenciación mesenquimal
- . Carcinoma metaplásico mixto
- . Carcinoma mioepitelial
- Subtipos raros:
 - . Carcinoma con características neuroendocrinas
 - . Carcinoma secretor
 - . Carcinoma papilar invasivo
 - . Carcinoma de células acínicas
 - . Carcinoma mucoepidermoide
 - . Carcinoma polimorfo
 - . Carcinoma oncocítico
 - . Carcinoma rico en lípidos
 - . Carcinoma de células claras rico en glucógeno
 - . Carcinoma sebáceo
 - . Tumores de glándulas salivales y anejos cutáneos

1.4.1.2 Tumores epiteliales y mioepiteliales

- Adenoma pleomórfico
- Adenomioepitelioma
- Carcinoma adenoide quístico

1.4.1.3 Lesiones precursoras:

- Carcinoma ductal “in situ”
- Neoplasia lobulillar
 - . Carcinoma lobulillar “in situ”
 - . Hiperplasia lobulillar atípica

1.4.1.4 Lesiones proliferativas intraductales

- Hiperplasia ductal usual
- Lesiones de células columnares incluyendo atipia epitelial plana
- Hiperplasia ductal atípica

1.4.1.5 Lesiones papilares:

- Papiloma intraductal
 - . Papiloma intraductal con hiperplasia atípica
 - . Papiloma intraductal con carcinoma ductal “in situ”
 - . Papiloma intraductal con carcinoma lobulillar “in situ”
- Carcinoma intraductal papilar
- Carcinoma papilar encapsulado
 - . Carcinoma papilar encapsulado con invasión
- Carcinoma papilar sólido
 - . “In situ”
 - . Invasivo

1.4.1.6 Proliferaciones epiteliales benignas

- Adenosis esclerosante
- Adenosis apocrina
- Adenosis microglandular
- Cicatriz radial/Lesión esclerosante compleja
- Adenomas:
 - . Adenoma tubular
 - . Adenoma de la lactancia
 - . Adenoma apocrino
 - . Adenoma ductal

1.4.2 TUMORES MESENQUIMALES

- Fascitis nodular
- Miofibroblastoma
- Fibromatosis de tipo desmoide
- Tumor miofibroblástico inflamatorio
- Lesiones vasculares benignas:
 - . Hemangioma
 - . Angiomatosis
 - . Lesiones vasculares atípicas

- Hiperplasia estromal pseudoangiomatosa
- Tumor de células granulosas
- Neurofibroma
- Schwannoma
- Lipoma
 - . Angiolipoma
- Liposarcoma
- Angiosarcoma
- Rabdomiosarcoma
- Osteosarcoma
- Leiomioma
- Leiomiosarcoma

1.4.3 TUMORES FIBROEPITELIALES

- Fibroadenoma
- Tumor Phyllodes
 - . Benigno
 - . Bordeline
 - . Maligno
 - . Sarcoma del estroma periductal
- Hamartoma

1.4.4 TUMORES DEL PEZÓN

- Adenoma de pezón
- Adenoma siringomatoso
- Enfermedad de Paget del pezón

1.4.5 LINFOMA MALIGNO

- Linfoma difuso de células B
- Linfoma Burkitt
- Linfoma de células T
- Linfoma extranodal de células B tipo MALT

- Linfoma folicular

1.4.6 TUMORES METASTÁSICOS

1.4.7 TUMORES DE LA MAMA MASCULINA

- Ginecomastia
- Carcinoma:
 - . Carcinoma invasivo
 - . Carcinoma in situ

1.4.8 PATRONES CLÍNICOS

- Carcinoma inflamatorio
- Carcinoma de mama bilateral

1.5 CLASIFICACIÓN TNM DEL CÁNCER DE MAMA

El sistema TNM elaborado por la AJCC y la UICC, actualizado por última vez en 2010 (AJCC Cancer Staging Manual, 7ª edición) (51), nos permite clasificar el cáncer de mama por estadios, según el tamaño tumoral (T), la afectación ganglionar (N) y la existencia o no de metástasis a distancia (M).

1.5.1 T (EXTENSIÓN DEL TUMOR PRIMARIO)

| | |
|---------------------------|---|
| T _x | El tumor primario no se puede evaluar |
| T ₀ | No hay evidencia de tumor primario |
| T _{is} | Carcinoma “in situ” |
| T _{is} (DCIS) | Carcinoma ductal “in situ” |
| T _{is} (LCIS) | Carcinoma lobulillar “in situ” |
| T _{is} (Paget’s) | Enfermedad de Paget del pezón no asociada a tumor |
| T ₁ | Tumor ≤ 2 cm de diámetro mayor |
| T _{1mi} | Tumor ≤ 1 mm de diámetro mayor |
| T _{1a} | Tumor > 1 mm pero < de 5 mm de diámetro mayor |
| T _{1b} | Tumor > 5 mm pero < de 10 mm de diámetro mayor |
| T _{1c} | Tumor > 10 mm pero < de 20 mm de diámetro mayor |
| T ₂ | Tumor > 20 mm pero < 50 mm de diámetro mayor |
| T ₃ | Tumor > 50 mm de diámetro mayor |
| T ₄ | Tumor de cualquier tamaño con extensión directa a la pared torácica y/o piel (ulceración o nódulos cutáneos |
| T _{4a} | Extensión a la pared torácica |
| T _{4b} | Ulceración y/o nódulos satélites y/o edema de la piel |
| T _{4c} | T _{4a} y T _{4b} |
| T _{4d} | Carcinoma inflamatorio |

1.5.2 N (AFECTACIÓN O NO DE LOS GÁNGLIOS LINFÁTICOS REGIONALES)

1.5.2.1 Clasificación clínica (cN)

- N_x Los ganglios linfáticos no se pueden valorar
- N₀ Sin evidencia de afectación de ganglios linfáticos regionales
- N₁ Adenopatías axilares homolaterales móviles en nivel I y II
- N₂ Adenopatías axilares homolaterales en los niveles I y II fijas, o formando un conglomerado; Afectación de la mamaria interna en ausencia de adenopatías axilares
- N_{2a} Adenopatías homolaterales axilares en los niveles I y II fijas o formando un conglomerado.
- N_{2b} Afectación de la mamaria interna en ausencia de adenopatías axilares
- N₃ Metástasis en región infraclavicular (nivel III axilar) homolateral, con o sin afectación de niveles I y II; o afectación de la mamaria interna con adenopatías en nivel I y II axilar; o metástasis en región supraclavicular homolateral con o sin afectación de axila o mamaria interna
- N_{3a} Metástasis en región infraclavicular homolateral (nivel III)
- N_{3b} Afectación de mamaria interna con adenopatías en nivel I y II axilar homolateral
- N_{3c} Metástasis en región supraclavicular homolateral con o sin afectación de axila o mamaria interna

1.5.2.2 Clasificación patológica (pN)

- pN_x No se pueden evaluar los ganglios linfáticos (porque no se realizó la linfadenectomía o porque se había realizado anteriormente)
- pN₀ Sin evidencia de afectación de los ganglios linfáticos regionales
- pN₀ (i-) Sin evidencia de afectación ganglilar histológica e inmunohistoquímica (IHC)

| | |
|------------------------|--|
| pN ₀ (i+) | Presencia de células tumorales ≤ 0,2 mm mediante H-E o IHC |
| pN ₀ (mol-) | Ausencia histológica y molecular de metástasis |
| pN ₀ (mol+) | Ausencia histológica e IHC negativa con hallazgos moleculares positivos |
| pN ₁ | Micrometástasis o metástasis en 1-3 ganglios linfáticos axilares o metástasis en ganglios de la cadena mamaria interna detectada mediante biopsia de ganglio centinela pero sin detección clínica. |
| pN _{1mi} | Micrometástasis (> 0,2 mm ó > 200 células, pero ninguna > 2 mm) |
| pN _{1a} | Metástasis en 1-3 ganglios axilares y al menos una de ellas > 2 mm |
| pN _{1b} | Metástasis en ganglios de la cadena mamaria interna con afectación micrometastásica o macrometastásica del ganglio centinela, sin detección clínica |
| pN _{1c} | Metástasis en 1-3 ganglios axilares y mamaros internos con micrometástasis o macrometástasis detectadas mediante biopsia de ganglio linfático, pero sin detección clínica |
| pN ₂ | Metástasis en 4-9 ganglios linfáticos axilares metástasis en ganglios linfáticos mamaros internos detectada clínicamente, en ausencia de metástasis en los ganglios linfáticos axilares |
| pN _{2a} | Metástasis en 4-9 ganglios linfáticos axilares (al menos un depósito tumoral > 2mm) |
| pN _{2b} | Metástasis en los ganglios linfáticos mamaros internos detectada clínicamente en ausencia de metástasis en los ganglios linfáticos axilares |
| pN ₃ | Metástasis en ≥ 10 ganglios axilares (al menos uno > 2 mm) o metástasis en los ganglios infraclaviculares (nivel III axilar) o |

metástasis en los ganglios linfáticos mamaros internos homolaterales detectada clínicamente en presencia de ≥ 1 ganglios linfáticos axilares positivos de grado I o II, o metástasis en los ganglios linfáticos homolaterales supraclaviculares.

pN_{3a} Metástasis en ≥ 10 ganglios linfáticos axilares (por lo menos un depósito tumoral > 2 mm) o metástasis en los ganglios infraclaviculares (nivel III axilar)

pN_{3b} Metástasis en $>$ de 3 ganglios linfáticos axilares y mamaros internos detectados clínicamente, o $>$ 3 ganglios axilares o afectación de cadena mamaria interna (micro o macrometástasis) sin detección clínica.

pN_{3c} Metástasis linfática supraclavicular homolateral

Cuando las pacientes reciben tratamiento quimioterápico Neoadyuvante en el informe anatomopatológico se añade “y” delante de la pN

1.5.3 M (METÁSTASIS A DISTANCIA)

M_x No evaluadas

M₀ No existen pruebas clínicas oradiológicas de metástasis a distancia

cM₀(i+) No hay prueba clínica ni radiográfica de metástasis a distancia, pero sí detección de depósitos de células tumorales moleculares o microscópicas en la sangre circulante, médula ósea u otros tejidos ganglionares que no son regionales de $\leq 0,2$ mm, en pacientes sin signos ni síntomas de metástasis.

M₁ Hay metástasis a distancia según lo determinan medios clínicos o radiológicos clásicos o se comprueba por medios histológicos que es $>0,2$ mm

1.5.4 AGRUPACIÓN POR ESTADIOS: Se describe en la tabla 1.

Tabla 1. Agrupación por estadios

| ESTADIOS | T | N | M |
|--------------|----------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|
| Estadio 0 | T_{is} | N_0 | M_0 |
| Estadio I | T_1 | N_0 | M_0 |
| Estadio IIA | T_0 T_1 T_2 | N_1 N_1 N_0 | M_0 M_0 M_0 |
| Estadio IIB | T_2 T_3 | N_1 N_0 | M_0 M_0 |
| Estadio IIIA | T_0 T_1 T_2 T_3 | N_2 N_2 N_2 N_1, N_2 | M_0 M_0 M_0 M_0 |
| Estadio IIIB | T_4 T_4 T_4 | N_0 N_1 N_2 | M_0 M_0 M_0 |
| Estadio IIIC | Cualquier T | N_3 | M_0 |
| Estadio IV | Cualquier T | Cualquier N | M_1 |

1.6 CLASIFICACIÓN MOLECULAR DEL CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea, que incluye muchas entidades clínicas, morfológicas y moleculares diferentes. Y aunque esto es algo reconocido por los clínicos y patólogos desde hace muchos años, ha sido durante la última década cuando se ha constatado de una forma más clara al haberse profundizado en el análisis de su “maquinaria molecular”.

Este avance ha sido posible gracias al desarrollo de sofisticadas tecnologías, como los microarrays de expresión génica, que permiten analizar simultáneamente la expresión de miles de genes en una única prueba, para crear un “retrato” molecular del tumor.

La evaluación cuantitativa de éstos, en lugar del estudio histopatológico de varias características del tumor, ofrece una caracterización más precisa de su biología, lo que permite, determinar con mayor precisión el comportamiento clínico del cáncer de mama y, posiblemente también, su respuesta al tratamiento (52).

En el año 2000, Perou y col definieron una lista de genes “intrínsecos”, es decir, genes cuya expresión varía mucho entre los tumores de diferentes pacientes en comparación con las muestras repetidas (53). El análisis de agrupamiento jerárquico utilizando esta lista de genes reveló la existencia de cuatro subtipos moleculares de cáncer de mama: Luminal, tipo HER₂, Basal y similar a la mama normal. Un estudio posterior de los mismos investigadores, con un número mayor de pacientes, puso de manifiesto que el grupo Luminal podía dividirse en al menos en dos grupos: Luminal A y B, y que los diferentes subtipos moleculares se asociaban con diferentes pronósticos (54).

Más recientemente se ha identificado un nuevo subtipo intrínseco de cáncer de mama conocido como Claudin-low (55). Son tumores del tipo “triple negativo”, de mal pronóstico, con una tasa de respuesta a la quimioterapia neoadyuvante intermedia entre los tumores basales y los luminales (56), que tienen propiedades biológicas similares a las de las células madre cancerosas.

Aunque los perfiles moleculares no han sustituido a los métodos diagnósticos convencionales, sí que han contribuido a un mejor entendimiento de la biología del cáncer de mama, influyendo en la toma de decisiones de tratamiento de las pacientes.

1.6.1 SUBTIPOS MOLECULARES

1.6.1.1 Subtipo Luminal A: Son los tumores de mama más frecuentes (50-60%), presentan elevados niveles de expresión de genes activados por el RE y bajos niveles de expresión de genes proliferativos (57).

El cáncer de mama Luminal A se caracteriza por la expresión de receptores de estrógenos (RE), receptores de progesterona (RP), Bcl-2 y citoqueratinas CK8/18 y por la ausencia de sobreexpresión de receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico (HER2).

Estos tumores generalmente muestran un bajo grado histológico y tienen un pronóstico excelente (58).

1.6.1.2 Subtipo Luminal B: (10-20%) Son los que peor se definen mediante técnicas de IHQ. Además de la expresión de RE y/o RP, a menudo expresan HER2, EGFR y ciclina E1.

La principal diferencia biológica entre éstos y los tumores Luminal A es el perfil de los genes de proliferación, tales como MK67 y ciclina B1, que tienen una mayor expresión en los Luminales B.

Suelen presentar un fenotipo más agresivo, con frecuencia muestran un mayor grado histológico y un mayor índice proliferativo y tienen un pronóstico significativamente peor que los Luminales A (59).

Como se demuestra en diferentes estudios son tumores quimio-resistentes y relativamente resistentes a la hormonoterapia (60).

1.6.1.3 Subtipo Her2: (10-15%) Estos tumores muestran una elevada expresión del gen HER2, genes asociados a la vía HER2 y genes de proliferación. Además de una baja expresión de la agrupación de genes luminales. Por esta razón, estos tumores suelen ser negativos para RE y RP, y positivos para HER2.

Es importante señalar, que este subtipo comprende sólo la mitad de los cánceres de mama HER+. La otra mitad que tiene alta expresión de HER2 se agrupa con genes luminales, clasificándose en el grupo Luminal B (61).

Morfológicamente son tumores altamente proliferativos que muestran un alto grado histológico. Desde el punto de vista clínico se caracterizan por un mal pronóstico, aunque su historia natural adversa se ha visto modificada en los últimos años por los avances terapéuticos de las terapias anti-HER2 (62) (63), ya que al igual que los tumores basales, presentan una elevada quimiosensibilidad.

1.6.1.4 Subtipo “Basal-like”: (10-20%) Reciben este nombre porque las células neoplásicas de estos tumores expresan genes que habitualmente se encuentran en las células basales y células mioepiteliales normales de la mama.

Se caracterizan por la baja expresión de los grupos de genes luminales y HER2, por ello, desde el punto de vista de IHQ son RE-, RP- y HER2-, lo que ha hecho que se denominen “triple negativo”. Sin embargo, aunque la mayoría de los tumores triple negativo se corresponden con el subtipo “Basal-like “de Perou, y la mayoría de los tumores basales son triple negativo, existen diferencias significativas entre ellos (64).

Algunos autores definen 2 grupos dentro de los “Basal like”, los que son triple negativo y con positividad para EGFR y citoqueratinas (CK) 5 y 6 y los que sólo son triple negativo (65).

Aunque no tienen rasgos específicos que permitan identificarlos de una forma útil en las tinciones de rutina, los carcinomas basales suelen ser de alto grado histológico, tienen un elevado índice mitótico, arquitectura sólida y necrosis central, bordes expansivos, infiltrado linfocitario prominente, escaso estroma y una elevada relación núcleo/citoplasma. Existe una fuerte asociación con los cánceres de mujeres BRCA1 mutado en la línea germinal, en los cuales casi el 90% son tumores Basal-like (66).

Este tipo de tumores clínicamente se caracterizan por ser más frecuentes en mujeres premenopáusicas, de ascendencia africana e hispana. No suelen presentar afectación ganglionar axilar. El riesgo de

recaída es máximo en los 3 primeros años tras el tratamiento y la mayoría de las muertes ocurren en los primeros 5 años. Tienden a metastatizar en el cerebro y los pulmones. Muestran una elevada tasa de respuesta a los esquemas de quimioterapia, pero paradójicamente, a pesar de ello son tumores que cuentan con un peor pronóstico (67).

1.6.1.5 Subtipo “Claudin-low”: (12-14%) Este subtipo se sitúa próximo al basal-like, ya que ambos comparten algunas características de expresión génica, como son una baja expresión de HER2 y del grupo de genes luminales. Lo que lo caracteriza es una baja expresión de los genes relacionados con las uniones estrechas y la adhesión intercelular y una elevada expresión de los genes relacionados con la respuesta inmune y genes de la matriz extracelular y mesenquimales (68).

La mayoría de estos tumores son carcinomas ductales infiltrantes de alto grado, con una alta frecuencia de diferenciación metaplásica y medular (69). Suelen mostrar un fenotipo triple negativo al igual que los tumores basales, aunque un 15% puede expresar receptores hormonales y otro 15% puede expresar el receptor HER2.

Además, este tipo de tumores presentan un mal pronóstico, y datos preliminares demuestran que tienen una tasa de respuesta a la quimioterapia neoadyuvante intermedia entre los tumores basales y los luminales, aunque futuros estudios nos ayudarán a determinar mejor la sensibilidad terapéutica de este subtipo (70).

1.7 TRATAMIENTO QUIRÚRGICO DEL CÁNCER DE MAMA

El tratamiento quirúrgico del cáncer de mama ha ido cambiando a lo largo de los años según ha ido avanzando el conocimiento de la enfermedad. Inicialmente se trataba como una enfermedad locorregional, que implicaba tratamientos locales muy agresivos (71). Pero ya desde 1972 se acepta el concepto de que nos encontramos ante una enfermedad sistémica con una alta capacidad de producir metástasis a distancia, que requiere un tratamiento multidisciplinario (72). Esto ha hecho que en la actualidad, en la mayoría de los casos, se empleen tratamientos quirúrgicos menos mutilantes, que permiten conservar la mama y la axila, y que asociados a la radioterapia, consiguen los mismos resultados que se obtenían realizando cirugías mucho más agresivas (73).

1.7.1 TRATAMIENTO QUIRÚRGICO DE LA MAMA

1.7.1.1 Tratamiento conservador: Pretende la conservación de la mama, mediante la escisión local, más o menos extensa del tumor, seguido de radioterapia complementaria. Precisa la resección del tumor con márgenes óptimos (microscópico mayor de 1 mm).

Contraindicaciones a la realización de este tratamiento serían: Radioterapia previa, desproporción entre el tamaño de la mama y el tumor, la existencia de microcalcificaciones extensas, márgenes positivos tras repetidas resecciones o preferencia de la paciente. La existencia de enfermedad multicéntrica (2 ó más tumores en cuadrantes separados), las enfermedades del colágeno y el embarazo, se pueden considerar contraindicaciones relativas.

1.7.1.2 Mastectomía: Implica la exéresis de la glándula mamaria, incluyendo la fascia del músculo pectoral mayor. Se realizará cuando está contraindicado el tratamiento conservador, haya imposibilidad de radioterapia adyuvante o por deseo expreso del la paciente. La técnica que se lleva a cabo habitualmente es una mastectomía total con

extirpación de piel y complejo areola-pezones sin desinserción de los músculos pectorales (tipo Madden). Aunque actualmente está extendiéndose la realización de mastectomías ahorradoras de piel (skin sparing) con reconstrucción inmediata, ya que se ha demostrado que son oncológicamente seguras, con tasas de recidiva local y supervivencia libre de enfermedad comparables a las de la técnica clásica (74).

1.7.2 TRATAMIENTO QUIRÚRGICO DE LA AXILA

El objetivo principal de la cirugía axilar en el cáncer de mama es el control local de la enfermedad y la estadificación del tumor (75), ya que como hemos comentado previamente, el estado de los ganglios axilares constituye el factor pronóstico más importante en esta enfermedad, y debe tenerse en cuenta para elegir la correcta estrategia terapéutica.

Para lograr estos objetivos durante la mayoría del siglo XX la linfadenectomía axilar (LA) se consideró el tratamiento quirúrgico estándar.

Esta técnica implica la extirpación de todo el tejido céluo-adiposo que está situado por debajo y por detrás de la vena axilar, de la hendidura formada por el músculo subescapular y la pared torácica y el situado a lo largo del surco formado por la pared torácica y el dorsal-ancho. Debe conservarse el paquete vasculo-nervioso de los músculos pectorales y el pedículo del dorsal ancho, así como los vasos subescapulares y el nervio torácico largo (76).

Pero como es bien sabido, la LA no está exenta de complicaciones, como son: Lesiones nerviosas, con aparición de parestesias y a veces afectación del paquete vasculonervioso del gran dorsal, seromas, linfedema crónico, infecciones del brazo, entorpecimiento en los movimientos del brazo...

Hasta finales del siglo pasado la LA se realizaba de forma sistemática en todo cáncer de mama, pero esto es algo que ha cambiado de forma radical en la actualidad, gracias a la técnica de biopsia selectiva de ganglio centinela, que

nos ha permitido realizar una estadificación de la enfermedad de una forma mínimamente invasiva en pacientes con axila clínicamente negativa.

1.8 BIOPSIA DE GANGLIO CENTINELA

El ganglio centinela (GC) es aquel ganglio que recibe el flujo linfático directamente de un tumor sólido invasor, flujo que posteriormente progresa hacia ganglios linfáticos secundarios y terciarios (figura 1).

A pesar de que anatómicamente el sistema linfático constituye una red vascular más o menos compleja, desde el punto de vista funcional, se produce un determinado orden direccional del flujo tumoral eferente, que se traduce en una “progresión ordenada” de las metástasis linfáticas tumorales cuando se inicia la invasión a distancia.

Por lo tanto, la localización y biopsia de este primer ganglio, en pacientes diagnosticadas de cáncer de mama, con axila clínica y ecográficamente negativa, va a predecir el estado histológico del resto de los ganglios axilares. Permitiendo prescindir de la LA en los casos en que dicho ganglio sea negativo.

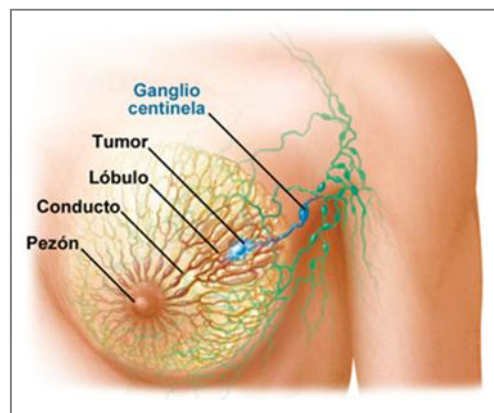


Figura 1. Representación de drenaje linfático desde un tumor de mama al ganglio centinela en la axila.

1.8.1 EVOLUCIÓN HISTÓRICA

El concepto de GC fue definido por primera vez en 1960 por Gould y col (77), en el cáncer de parótida. Pero fue el urólogo R. Cabañas en 1977 quien, en su estudio sobre cáncer de pene, realizó una verdadera formulación de la hipótesis del GC. Con contraste radiológico y guiándose por linfangiografía en pacientes con cáncer de pene, fue capaz de localizar este ganglio,

describiéndolo como la primera localización de las metástasis ganglionares, indicando, que si su biopsia era negativa, se podía evitar la resección en bloque del resto de los ganglios de la cadena inguino-fémoro-iliaca (78). Pero este trabajo tuvo poca difusión, hasta 1992 en que Morton y col (79) recuperan el concepto de GC aplicado al tratamiento del melanoma y en 1994 Giuliano y col lo describen en el cáncer de mama (80). Estos autores consiguen localizar el GC intraoperatoriamente gracias al uso de colorantes vitales, algo que también habían conseguido Krag y col (81) en 1993 utilizando trazadores isotópicos y una sonda de detección gamma durante la intervención, en casos de cáncer de mama.

En 1996 Albertini y col (82) publican un trabajo en el combinan ambos métodos de localización, consiguiendo una mejora de los resultados.

A partir de ese momento la validación del procedimiento de BSGC, condujo al abandono progresivo de la realización rutinaria de la LA en las pacientes tratadas de cáncer de mama con axilas clínica y ecográficamente negativas. Reservándose únicamente para aquellos casos en que se detectasen metástasis en el GC o éste no se consiguiese identificar (83).

1.8.2 INDICACIÓN CLÍNICA

Los criterios de inclusión y exclusión para realizar la técnica de BSGC, consensuados por la Sociedad Española de Senología y Patología en la revisión del 2013 se resumen en la tabla 2 (84).

Tabla 2. Criterios de inclusión y exclusión para BSGC

INDICACIONES

1. Carcinomas infiltrantes T1, T2 y T3, siempre que la axila sea clínica, ecográfica y patológicamente negativa.
2. Carcinoma intraductal con indicación de mastectomía. Puede considerarse en casos de alto riesgo de microinfiltración.
3. En el carcinoma de mama del varón, se siguen las mismas indicaciones que en la mujer.

CONTRAINDICACIONES

1. La verificación preoperatoria de afectación ganglionar mediante pruebas de imagen (ecografía) y, al menos, citología de las adenopatías sospechosas con diagnóstico compatible con metástasis de carcinoma.
2. Carcinoma inflamatorio.
3. Radioterapia axilar previa a dosis de 50 Gy.
4. Carcinoma localmente avanzado con infiltración ganglionar, en ausencia de tratamiento sistémico primario.

Según el consenso, no constituyen criterios de contraindicación para realizar la BSGC los siguientes:

- La realización de una biopsia escisional previa, siempre que no aparezcan criterios de exclusión.
- Cirugía plástica de aumento o reducción mamaria previa.
- Tumores multifocales o multicéntricos.
- Cirugía conservadora con BSGC previa por carcinoma. No hay evidencia para contraindicar una nueva BSGC, aunque es necesaria la valoración individual de cada caso, en función de la dosis de irradiación recibida en la axila.

- Mujeres gestantes o puérperas lactantes, previa la retirada de la lactancia 24 horas (85). Se recomienda utilizar la mínima dosis posible de trazador y realizar la inyección el mismo día de la cirugía. En estos casos está contraindicado el uso de cualquier colorante vital.
- La BSGC en pacientes subsidiarias de quimioterapia neoadyuvante sigue siendo en este momento un tema que suscita controversia. Las indicaciones han cambiado a medida que se ha ido adquiriendo experiencia. Inicialmente no era aceptada la realización de la BSGC después de la quimioterapia, ya que no existía un nivel de evidencia suficiente. En el año 2013 se publicaron los resultados del estudio SENTINA (86) y el ACOSOG Z1071 (87). En ambos, la tasa de identificación del GC postneoadyuvancia, es inferior a la técnica estándar y la tasa de falsos negativos superior, que en las pacientes no tratadas con quimioterapia. No obstante los dos estudios coinciden en la importancia de dos factores que mejoran ambos parámetros, que son, el número de GC analizados y la utilización combinada de radiofármacos y colorantes.

La inclusión de la ecografía axilar antes y después de la quimioterapia ha añadido una mayor eficacia en la selección de las pacientes. Los ganglios afectos pueden ser marcados con una semilla de I^{125} o con una semilla metálica, lo que permite la extirpación guiada de los mismos durante la intervención quirúrgica y el estudio intraoperatorio, valorando la respuesta al tratamiento neoadyuvante (88).

1.8.3 TÉCNICAS PARA LA LOCALIZACIÓN DEL GC

Para la localización del GC se utilizan dos tipos de sustancias: los colorantes y las partículas coloidales marcadas con un isótopo radiactivo (generalmente ^{99m}Tc).

Ambas se inyectan en la vecindad de la lesión y difunden por los capilares linfáticos hasta los ganglios, depositándose en el primero de la cadena linfática regional a la que drena dicho tumor.

Describiremos ambas técnicas. Pero en el momento actual se considera imprescindible el uso del radiotrazador como marcador del ganglio. Es aceptable utilizar la técnica mixta, fundamentalmente en el periodo de aprendizaje y en aquellos casos con dificultades de visualización en la linfogammagrafía preoperatorio, pero se desaconseja el uso exclusivo de colorante (89).

1.8.3.1 Técnica con colorantes: Los colorantes recomendados en la actualización del consenso sobre biopsia selectiva de ganglio centinela en cáncer de mama de la Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria (2013) son el azul de metileno, azul patente y azul de isosulfán (84).

La técnica consiste en la inyección del colorante alrededor del tumor o en el plexo subareolar en caso de lesiones no palpables. Pasados entre 5-20 minutos se realiza la incisión a nivel axilar, identificando los linfáticos aferentes teñidos, que confluyen hacia el GC teñido.

Es una técnica sencilla, que no precisa de medios técnicos adicionales, y que permite el control visual del GC teñido. Sin embargo, tiene varios inconvenientes, como son la necesidad de una mayor incisión quirúrgica, fundamentalmente en el periodo de aprendizaje, para visualizar los linfáticos y los GC teñidos, el desconocimiento previo de la localización y el número de GC y drenajes múltiples, al no tener una linfogammagrafía previa y la posibilidad de reacciones adversas graves (90), por lo que la inyección debe realizarse en quirófano tras la inducción anestésica.

1.8.3.2 Técnica con isótopos: Se basa en la utilización de pequeñas sustancias coloidales o micelas, que se marcan con ^{99m}Tc .

Las sustancias coloidales son moléculas de tamaño variable, sin ninguna afinidad por las células tumorales que al ser inyectadas en el tejido intersticial se introducen en los capilares linfáticos, desde donde son transportadas hasta los ganglios. Una vez allí, son fagocitadas por los

macrófagos donde permanecen, hasta ser destruidas, lo que permite la visualización del GC en la gammagrafía y su posterior localización en quirófano con la sonda detectora. Cuando el GC está extensamente invadido por metástasis, se bloquea el mecanismo fagocitario, desviando el radiotrazador a otro ganglio no centinela, lo que puede dar lugar a errores de localización del GC.

Estas moléculas, deben tener un tamaño lo suficientemente pequeño para facilitar la rápida migración a los capilares linfáticos, y lo suficientemente grande para no pasar al torrente sanguíneo. En Europa, se utilizan habitualmente coloides de tamaño intermedio, como el ^{99m}Tc -albúmina nanocoloide (50-100 nm) y el ^{99m}Tc -sulfuro de renio coloidal (100 nm).

El tipo de inyección del radiotrazador ha constituido el aspecto más controvertido del procedimiento de la BSGC en el cáncer de mama. Se distinguen inyecciones superficiales (cutáneo-areolares) y profundas (peri o intratumorales). En las primeras existe un porcentaje mínimo de visualizaciones de ganglios linfáticos no axilares. En las segundas éstos se objetivan en el 20-40% de los casos, reflejando por lo tanto vías separadas para el drenaje profundo y el superficial (91). Dentro de estas distintas opciones se proponen también protocolos de inyección doble o combinada (superficial y profunda), de modo sincrónico, para aprovechar las ventajas técnicas de ambos métodos (92).

La dosis varía entre 18,5-111 MBq (0,5-3 mCi), en función del tiempo transcurrido desde la inyección hasta la intervención quirúrgica (que puede ir de 2 a 24 horas). El volumen administrado varía entre 0,2-3 ml según los centros (93), puede inyectarse en una o varias dosis (entre 2 y 4).

Posteriormente a la inyección se realiza la linfogammagrafía para valorar la distribución del radiotrazador. Se prefiere una gammacámara con campo de visión amplio. Las imágenes deben ser obtenidas de

forma secuencial, en diversas proyecciones y a distintos intervalos de tiempo. La rapidez con la que se detecta el GC varía según la vía de administración utilizada. Se adquieren imágenes desde los 15-30 minutos de la inyección, hasta las 2-4 horas, o hasta la identificación del GC. Si se realiza el día anterior a la intervención, se puede adquirir una imagen tardía (16-24 h), en los casos en los que no se haya identificado el ganglio. Esta técnica proporciona una clara visualización de los GC, ofreciendo información sobre su número y localización, lo que permite realizar marcas cutáneas que nos ayudarán a su localización durante la cirugía.

Si se dispone de equipos SPECT-CT, se aconseja utilizarlos, en los casos en los que no se haya conseguido identificar el GC en la linfogammagrafía, o cuando se prevea que una localización anatómica más precisa pueda simplificar significativamente la intervención quirúrgica, como en el caso de ganglios con aparente bajo contaje o ganglios extraaxilares.

Para la detección intraoperatoria del GC se utiliza una sonda portátil detectora de partículas gamma (figura 2). Existen múltiples modelos, con pequeñas diferencias entre ellos, pero lo que se recomienda de forma general es que el sistema sea ergonómico, manejable y con un dispositivo de visualización que ofrezca simultáneamente la cifra de cuentas obtenida y una señal audible en concordancia.

Se considera como GC durante el acto quirúrgico, el que presenta una actividad máxima en la región donde se ha localizado previamente en la linfogammagrafía, así como todos los ganglios con una actividad significativa superior al 10% de la cifra máxima obtenida en el GC anterior (94). Debe realizarse una exploración exhaustiva de la axila o de las zonas previamente marcadas para asegurar que no hay actividad significativa que sugiera la posibilidad de otros GC.

Finalmente, debe realizarse una exploración exhaustiva del lecho quirúrgico, recomendándose la extirpación de cualquier otro ganglio palpable, sospechoso de afectación metastásica, independientemente de contaje. Esta maniobra disminuye el número de falsos negativos (95)



Figura 2. Gamma-sonda para detección intraoperatoria de GC.

La detección gammagráfica de GC(s) en la cadena mamaria interna debe conllevar su biopsia, siempre que sea técnicamente factible.

Ante la no migración del trazador a la axila y sólo hacia la mamaria interna, se puede realizar la inyección con colorante, recomendando seguir la misma metodología de la inyección de isótopo. También es posible la realización de reinyección de radio-trazador o el seguimiento clínico y con técnicas de imagen (96).

1.8.4 ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO DEL GANGLIO CENTINELA

El diagnóstico del/los GC debe ser intraoperatorio siempre que sea posible, para aumentar la eficiencia de la técnica (97), excepto en el caso de afectación de la cadena mamaria interna, cuya biopsia intraoperatoria no es necesaria porque no entraña ningún gesto quirúrgico adicional.

Son aceptables hasta tres GC, aunque es recomendable limitar su número a dos.

Existen diversas técnicas para el estudio anatomopatológico del ganglio centinela.

1.8.4.1 Estudio histológico convencional: Suelen utilizarse dos técnicas:

- La técnica de congelación en parafina: Debe consistir en secciones a distintos niveles del ganglio y posterior tinción con Hematoxilina-Eosina (HE), que permitan detectar, por lo menos, metástasis de más de 2 mm (98). La especificidad de la prueba oscila alrededor del 99%. Sin embargo tiene una sensibilidad de entre el 40-80%, especialmente para las metástasis menores de 2 mm y para los carcinomas lobulillares (99). El sistema TNM (51), basándose en el diámetro tumoral como factor pronóstico, medido en milímetros sobre la sección de HE, clasificó las metástasis en 3 tipos distintos:

I. < 0,2 mm: Células tumorales aisladas (CTA)

II. > 0,2 mm ≤ 2 mm: Micrometástasis

III. > 2 mm: Macrometástasis

- Extensión citológica mediante improntas o raspado: Técnica sencilla, rápida y barata, pero menos precisa que la anterior, por lo que no suele ser un método recomendado.

En ambos casos no es posible realizar el estudio del GC en su totalidad, por lo que es necesario un estudio diferido del ganglio restante, realizando secciones cada 200 μ.

1.8.4.2 Técnicas de inmunohistoquímica (IHQ): Para estudio diferido del ganglio, es aceptable, en caso de duda, el uso de anticuerpos anticitoqueratina AE1/AE3, CK7, CK19, CAM5.2 ó anticuerpos contra el antígeno de la membrana epitelial EMA. Tienen una buena relación coste-efectividad e incrementan entre un 15-20% la detección de micrometástasis (100).

1.8.4.2 Estudio molecular: El método actualmente más recomendado en España, para el estudio intraoperatorio del GC es el método molecular OSNA® (One Step Nucleic Acid Amplification) (Sysmex)(91).

Es una técnica desarrollada en Japón en el año 2000, cuyo fundamento consiste en una PCR mediada por bucles, diseñada para la amplificación del ARNm de la Citoqueratina1 (ARNm-CK19). El ARNm-CK19 fue

seleccionado como marcador de elección, después de haber sido comparado con otros 45 marcadores, por ser el que mostró mejor capacidad de discriminar entre ganglio metastásico y no metastásico (101).

La reacción de amplificación tiene lugar en condiciones isotermas (65°C), lo cual evita la amplificación simultánea del ADN genómico, en un tiempo aproximado de 16 minutos para la primera muestra y de 1 minuto para cada muestra añadida. La reacción de amplificación se detecta por medio de un detector de amplificación génica, que cuantifica el número de copias de ARNm-CK19 sin necesidad de extracción ni purificación previa de los ácidos nucleicos.

La correlación entre el número de copias de ARNm-CK19 y el tamaño de la metástasis, se determinó por análisis estadístico de la distribución logarítmica normal del número de copias, obtenido del estudio OSNA® de 106 ganglios linfáticos (102).

La macrometástasis se definió por el número de copias de ARNm-CK19 contenidas en un bloque de tejido tumoral de 2 mm, correspondiente a un número igual o superior a 5000 copias/ μ l. Valores comprendidos entre 250-5000 copias/ μ l, se consideran micrometástasis. Valores inferiores a 250 copias se consideran negativos.

Actualmente se ha introducido el concepto de “Carga Tumoral Total” (CTT), sólo aplicable al estudio molecular del GC, definido como la suma del número de copias de ARNm-CK19 de cada uno de los GC. Esta variable constituye una herramienta de gran impacto clínico (103), al facilitar la toma de decisiones terapéuticas sobre la axila durante el acto quirúrgico y permite definir distintos puntos de corte, en función de la sensibilidad y especificidad deseadas, tanto para la afectación (metástasis sí-no) de los ganglios no-centinela, como para la predicción del número de ganglios axilares no-centinela metastatizados. Peg y col

recomiendan el punto de corte de 15000 copias para la indicación de linfadenectomía axilar (104).

Las ventajas que ofrece OSNA® respecto al estudio histológico, son que permite el estudio del GC en su totalidad, sin pérdida de tejido y en un tiempo asumible intraoperatoriamente. Que cuantifica de forma precisa y reproducible el volumen de la metástasis y que elimina la variabilidad interobservador.

Como inconveniente, no se puede realizar esta técnica en aquellas pacientes en las que no se exprese CK19 en más del 30% de las células tumorales (técnica de inmunohistoquímica) en la biopsia con aguja gruesa que se realiza en el momento del diagnóstico del tumor.

1.8.5 CONDUCTA A SEGUIR ANTE UN GC AXILAR POSITIVO. ¿ES POSIBLE EVITAR LA LINFADENECTOMÍA AXILAR? SITUACIÓN ACTUAL.

Como ya hemos comentado previamente, a día de hoy, la BSGC es la técnica estándar para la estadificación ganglionar, en pacientes diagnosticadas de cáncer de mama, con axila clínica y ecográficamente negativa. Y se ha mostrado, tan eficaz como la LA, en pacientes con GC negativo, en cuanto a supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global (105) (106).

Por otro lado, la puesta en marcha de los programas de cribado poblacionales ha dado como resultado el diagnóstico de la enfermedad en etapas más tempranas y por tanto sin afectación, o con mínima afectación ganglionar. La BSGC ha permitido en estos casos, evitar la LA a un 60-70% de las pacientes por tener el GC negativo.

También gracias a la técnica de BSGC se ha incrementado la detección de micrometástasis, debido al mayor número de cortes seriados con HE y al uso de IHQ, alcanzando cifra de entre el 15-48% según la literatura (107).

Por todo lo anterior, entre el 40-70% de los casos en que el GC está afecto, el resto de los ganglios de la LA están libres de enfermedad (108), porcentaje que aumenta hasta el 80-85% en el caso de las micrometástasis (109).

Llegados a este punto se plantea la pregunta de cómo identificar a esas pacientes en las que el GC es el único positivo, evitando así la realización de una LA que únicamente nos aportaría morbilidad.

Surgen entonces, a partir de 2002, múltiples trabajos en busca de factores que nos ayuden a encontrar la respuesta.

En 2003 se publica un primer meta-análisis, realizado por Degnim y col (110), que recoge los resultados de 15 de estos estudios, de los que seleccionan 11. De este trabajo surgen los factores pronóstico que son más frecuentes y que, en diferente orden y porcentaje, se van a repetir en la mayoría de los estudios publicados, que son: El tamaño de las metástasis del GC, el tamaño tumoral del tumor primario, la invasión linfovascular, la extensión extranodal y el número de GC positivos.

Se presenta entonces el primer nomograma, desde el Memorial de Nueva York (MSKCC) (111), que sigue siendo hoy en día el de mayor difusión en la práctica clínica. Se considera que es el que presenta la mayor discriminación para predecir la probabilidad de metástasis en los ganglios no centinela. Sin embargo, una de las principales críticas a este nomograma, ha sido la no inclusión de la variable tamaño de la metástasis, como variable independiente, que en muchos trabajos aparece como el parámetro de mayor valor estadístico para evitar la LA (112).

A partir de ese momento fueron apareciendo un buen número de nomogramas valorando estos factores pronósticos, para el diagnóstico del estado del resto de la axila, cuando nos encontramos un GC positivo.

A parte del MSKCC, los más utilizados son los de Stanford (113), Cambridge (114) y el Hospital Tenon (115).

Sin embargo, se considera, que la utilización de nomogramas como elemento único en la toma de decisiones clínicas tiene dos limitaciones. Por un lado, se dice que constituyen un elemento valioso en la institución de origen, pero pueden perder su precisión cuando se aplican a otras instituciones porque el perfil de las pacientes puede ser diferente. Y por otro lado, los nomogramas

actuales no incluyen los subtipos tumorales como variable independiente (sólo el del MSKCC incluye los receptores estrogénicos), algo que según estudios recientes ayudaría a aumentar su precisión predictiva (116)

Por todo ello, la aplicación de los nomogramas, puede considerarse como un elemento más en la toma de decisiones, pero no el único, siendo fundamental individualizar cada caso (117).

Respecto a la necesidad de realizar o no una LA en las pacientes en las que se detectan micrometástasis en el GC, se han publicado múltiples trabajos (118), con resultados muy dispares. Algunos de ellos concluyen que la presencia de micrometástasis en el GC se asocia a un porcentaje no despreciable de afectación del resto de los ganglios axilares (15%) (119), con un impacto significativo en la evolución clínica, disminuyendo el tiempo libre de enfermedad (120) y aumentando el número de recaídas regionales (121). Sin embargo otros, como el estudio IBCSG 23-01 del “International Breast Cancer Study Group” (122) que incluyó 934 pacientes con micrometástasis y tumores menores de 5 cm, randomizadas en dos grupos, uno a LA y otro a control, tras un periodo de seguimiento de 49 meses, no encontró diferencias significativas en cuando a supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global.

En la actualidad y siguiendo las recomendaciones del Consenso Internacional de St. Gallen 2011 (123), se considera que se puede evitar la linfadenectomía axilar en los casos en que se detecten micrometástasis en un solo ganglio centinela, independientemente del tipo de cirugía realizada. Aunque para algunos autores no hay suficiente evidencia para aplicarlo a las pacientes mastectomizadas, debido a que no recibirán tratamiento radioterápico posterior (124)

Pero la principal controversia en la actualidad se centra en las mujeres con afectación del GC por macrometástasis. Hasta hace pocos años no había dudas de que ante la detección de macrometástasis en el GC lo indicado era realizar una LA, pero desde la publicación del ensayo ACOSOG Z0011 de Giuliano y cols (125) este concepto ha ido cambiando, y es a día de hoy un tema que genera un gran debate.

El trabajo de Giuliano y cols es un estudio multicéntrico, prospectivo y randomizado, que incluye 891 pacientes diagnosticadas de carcinoma infiltrante de mama entre 1999 y 2004, con tumores menores de 5 cm (T1-T2), sin afectación clínica axilar, con ≤ 2 GC positivos (se excluyeron las que presentaban invasión extracapsular) y tratadas con cirugía conservadora. Todas las pacientes recibieron radioterapia tangencial y tratamiento adyuvante sistémico posterior. Fueron aleatorizadas en dos grupos: 446 a observación y 445 a LA (se exigió un mínimo de 10 ganglios). Tras un seguimiento mínimo de 6 años, objetivó que no existían diferencias significativas en el intervalo libre de enfermedad ni en la supervivencia global entre ambos brazos de tratamiento. Por lo tanto, ante estos resultados los autores concluyeron que en aquellas mujeres con tumores que cumplan los criterios de inclusión descritos en el estudio, se podía evitar la realización de una LA.

Sin embargo, se han criticado de forma insistente algunos aspectos de este trabajo, porque se considera que presenta debilidades metodológicas importantes (126) como son:

- El haber reclutado menos de la mitad de las pacientes previstas en el diseño inicial del estudio (1900 pacientes).
- Que no haya uniformidad en las características de ambos grupos de pacientes. Ya que sí parece existir una tendencia a la inclusión de casos más avanzados en el grupo de la linfadenectomía, con tumores de mayor tamaño, mayor invasión linfovascular y un mayor número de ganglios axilares afectos.
- El 80% de las pacientes tenían receptores de estrógeno positivos, lo que sesga la muestra hacia tumores de buen comportamiento biológico y susceptibles a la manipulación hormonal.
- La no realización de estudios del c-erb-B2, ya que al inicio del estudio no era un procedimiento estándar en el estudio histológico (127), lo cual limita el análisis de los datos en los tumores con expresión de esta oncoproteína o en los triple negativos.

- Otros como incluir a casi un 50% de pacientes con micrometástasis, un 7% de pacientes sin GC afecto y a un 13,7% (en el grupo de LA) con más de 4 GC afectos.

A pesar de toda la controversia suscitada por este estudio, otras publicaciones apoyaron estos resultados (128) y en muchos centros se comenzó a abandonar la LA en aquellas pacientes con macrometástasis en el GC, que cumplían los criterios de Giuliano (129). Aunque algunos grupos continúan cuestionando su aplicación (130).

A día de hoy las recomendaciones de las principales sociedades y guías sobre este tema son:

- Sociedad Europea de Oncología (ESMO) (131): Exponen los resultados del estudio de Giuliano et al (125): En las pacientes con tumores invasivos de mama T1-T2 y cN0, con 1-2 ganglios centinela positivos, que reciban irradiación tangencial adyuvante, podría evitarse la LA, ya que las tasas de supervivencia global, tiempo libre de enfermedad y recurrencia local, son similares a las de las pacientes sometidas a cirugía axilar.

Describen también, que otra opción en los casos con cN0 y ganglios centinela metastásicos, es la irradiación axilar, como demuestra el estudio AMAROS (del que hablaremos más adelante).

Sin embargo, concluyen con que estos resultados necesitan ser confirmados, y no pueden extenderse a pacientes con características diferentes a los incluidos en el estudio de Giuliano.

- Sociedad Americana de Oncología (ASCO) (132): Los clínicos no deberían recomendar la LA a mujeres con cáncer de mama en estadios iniciales, con 1-2 GC metastásicos, en las que se vaya a realizar cirugía conservadora y radioterapia convencional fraccionada de toda la mama. Nivel de evidencia: Fuerte. Nivel de recomendación: Alto.
- Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria (SESPM) (84): No constituye indicación de linfadenectomía axilar los casos con baja carga

tumoral o perfil de bajo riesgo. Se considera perfil de bajo riesgo la confluencia de los siguientes factores: Hasta un máximo de 2 GC metastásicos, estatus postmenopaúsico, tamaño del tumor primario menor de 3 cm, grado histológico 1 ó 2, RE y RP positivos, Her2 negativo, Ki67 \leq 14%, cirugía conservadora.

Constituye indicación de linfadenectomía axilar una carga tumoral mayor de 10000-15000 copias (OSNA) y el diagnóstico de macrometástasis (TNM, 7ª edición) (51), salvo en el contexto de pacientes con criterios de “bajo riesgo” del tumor primario, pacientes que cumplan los criterios del ensayo Z0011 o en el contexto de ensayos clínicos.

Añaden que el diagnóstico de macrometástasis en el GC, sin linfadenectomía axilar, constituye indicación de irradiación axilar, niveles I y II (dosis recomendada 50 Gy, con una técnica adecuada al volumen a irradiar).

- “National Comprehensive Cancer Network” (NCCN) (133): En pacientes con GC positivo se podría evitar la LA si la pacientes cumpliera con TODOS los siguientes criterios: Tumor T1 ó T2. 1 ó 2 GC positivos. Cirugía conservadora. Radioterapia completa de la mama. No haber recibido quimioterapia neoadyuvante (Nivel de evidencia IIA)

Para las pacientes con axila clínicamente negativa a las que se vaya a realizar mastectomía y para las que está prevista la radioterapia, la irradiación axilar de los niveles I y II puede sustituir a la LA, para el control regional de la enfermedad.

En lo que respecta a tratar a las pacientes con macrometástasis en el GC con radioterapia en vez de cirugía (LA), en el año 2014 se publicaron los resultados del ensayo AMAROS (134) que pusieron de manifiesto que la radioterapia axilar proporciona los mismos resultados que la LA en pacientes tratadas de cáncer de mama T1-T2, sin adenopatías palpables y con GC positivo.

Varios estudios y guías clínicas (como ya hemos comentado), hoy en día, apoyan que el diagnóstico de macrometástasis en el GC sin LA, constituye indicación de irradiación de los niveles I y II axilar (133) (135).

Y aunque el tratamiento radioterápico a nivel de la axila genera menor morbilidad que la LA (134), el porcentaje de linfedema en estas pacientes aún alcanza el 15% (25% en pacientes con LA) (136).

En la actualidad hay en marcha dos ensayos clínicos que tratan de dar respuesta a en qué pacientes con macrometástasis en el GC se podría evitar el tratamiento local de la axila (tanto quirúrgico como radioterápico), que son el POSNOC (137), que aleatoriza pacientes tratadas de cáncer de mama (T1-T2), con macrometástasis en 1 ó 2 GC, a las que se realiza mastectomía o cirugía conservadora, en 2 grupos. Al primero se les administra tratamiento sistémico adyuvante (quimioterapia y/o hormonoterapia) exclusivamente, y al segundo tratamiento sistémico adyuvante y tratamiento local sobre la axila (LA o radioterapia axilar). Y otro ensayo que es el OPTIMAL (138), cuyo objetivo es mostrar la no inferioridad de la irradiación incidental de la axila, comparada con la irradiación intencional, en términos de tiempo libre de enfermedad a 5 años, en pacientes con afectación limitada del GC determinado por OSNA (entre 250-15000 copias), tratadas con cirugía conservadora sin LA.

Pero, Llegados a este punto, podemos decir que a día de hoy, aún no existe un consenso claro sobre que actitud seguir ante una paciente en la que se detecten macrometástasis en el GC, ya que existe una gran variabilidad en la práctica clínica entre distintos centros (139).

Ante toda esta perspectiva actual, se impone la búsqueda de nuevos factores predictivos, de cara a optimizar la estrategia terapéutica en estas pacientes.

El grupo del Dr. Vizoso (140) (141) ha realizado estudios sobre una variedad de parámetros biológicos en el centro y la frontera de los cánceres de mama y en los ganglios linfáticos axilares metastásicos. Factores entre los que se encuentran las metaloproteasas de matriz (MMPs) y sus inhibidores (TIMPs), así como algunos factores de transcripción, como Pit-1.

Y han encontrado que la expresión de MMP1 (Colagenasa intersticial) por las células mononucleares inflamatorias (MICs) en los GC positivos, predice de forma significativa el estado de los ganglios no centinela (GNC) en el cáncer de mama. Concluyendo en el trabajo publicado en 2013 en la “European Journal of Cancer” (142), que en todos los casos estudiados en los que no se objetivó expresión de MMP1 por las MICs de los GC positivos, el resto de los GNC no estaban afectados ($p < 0,0001$). Por lo tanto, podríamos decir que en estas pacientes no sería necesario realizar ningún tratamiento adicional sobre la axila.

1.9 METALOPROTEASAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR

Las metaloproteasas (MMPs) son una familia de endopeptidasas (enzimas proteolíticas) dependientes de calcio y zinc, capaces de degradar diferentes componentes de la membrana extracelular (ME), de las que se han identificado 23 variantes en humanos (143). Se clasifican de acuerdo con el sustrato que degradan y con la organización de sus dominios en colagenasas intersticiales, gelatinasas, estromelinas, matrilisinas y MMPs asociadas a membrana (MT-MMPs). Existen 8 MMPs que se incluyen en un grupo a parte, aún cuando algunas de ellas presentan características similares a las estromelinas (144) (tabla 3).

Para nombrar a las MMPs se han utilizado 29 números. No todos aparecen en la tabla 3, ya que los símbolos correspondientes a MMP-4, MMP-5 y MMP-6 son redundantes en humanos, por lo que ya no se usan. MMP-18 se encuentra sólo en *Xenopus laevis* y la correspondiente en humano ahora se identifica como MMP-19. MMP-22 fue clonada originalmente en fibroblastos de embriones de pollo (145).

La mayoría de las MMPs son secretadas como proenzimas (zimógenos), que son activadas proteolíticamente en el espacio extracelular (146). Las MMPs activadas pueden, a su vez, activar a otras MMPs, dando lugar a mecanismos de retroalimentación positiva.

La actividad de las MMPs se encuentra regulada, en parte, por los inhibidores tisulares de las MMPs (TIMPs) (147). Los TIMPs son una familia de cuatro proteínas de secreción, que se unen al sitio catalítico de las MMPs, inhibiendo su actividad, pero también participan en la activación de estas enzimas, al formar complejos con sus formas latentes.

Además de ésta, se han señalado otras actividades de los TIMPs, como son la inducción de la apoptosis o su capacidad de bloquear la angiogénesis (148), bloqueando el proceso de invasión tumoral y el desarrollo de metástasis. Sin embargo, otros estudios han demostrado que la expresión tumoral de TIMP-1 en el carcinoma gástrico (149) y mamario (150), se asocia de forma independiente con un peor pronóstico de los

pacientes. Estos datos nos resultan indicativos del complejo papel que desempeñan los TIMPs en el proceso tumoral.

Respecto a las MMPs, se sabe que desempeñan un papel esencial en el recambio y la remodelación tisular (151). Participando en procesos fisiológicos, como son la reparación de tejidos dañados, el crecimiento óseo, la angiogénesis y la cicatrización (152). Sin embargo, una excesiva o inadecuada expresión de MMPs puede influir en el desarrollo de numerosos procesos patológicos como la artritis, las enfermedades vasculares (153), la enfermedad periodontal (154), la esclerosis múltiple, la invasión tumoral y las metástasis (155).

Uno de los principales mecanismos de acción por el que las MMPs favorecen la invasión tumoral y el desarrollo de metástasis, se basa en la capacidad que tienen de degradar el tejido conectivo estromal y los componentes de la membrana basal. Varias citoquinas y factores de crecimiento (156), estimulan la secreción de MMPs por las células neoplásicas y las células del estroma (fibroblastos y células de la inflamación) en la zona de invasión del tumor, contribuyendo a la expansión del mismo.

Otro evento importante en la progresión del cáncer es la angiogénesis. Y también en él juegan un papel activo las MMPs, propiciando no sólo un lugar para el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos al degradar los componentes de la matriz estromal, sino que también contribuyen a la destrucción de ciertos sustratos. Favoreciendo que se liberen, activen o generen moléculas que puedan actuar como inductores o inhibidores de la angiogénesis (157).

Una vez que las células tumorales han migrado del tumor primario, pueden caer en apoptosis; sin embargo, también en este momento las MMPs (MMP-7 MMP-9, MMP-10 y MMP-15) tienen su protagonismo, actuando como factores antiapoptóticos y permitiendo su diseminación (158).

Se han publicado múltiples estudios que relacionan la sobreexpresión de las MMPs con el desarrollo de diferentes tipos de cáncer como el colorrectal (159), de próstata (160), el carcinoma hepatocelular (161) y el de mama (162) (163).

En lo que respecta al cáncer de mama, se ha visto que las MMPs pueden servir, no sólo como potentes marcadores para el diagnóstico, detección temprana y pronóstico, sino

también como indicadores de recurrencia, diseminación metastásica y respuesta a la terapia primaria y adyuvante (164).

Varias MMPs han sido estudiadas como factores pronósticos en el CM, especialmente MMP-2 (165) y MMP-9 (166), relacionándose ambas con un incremento en la incidencia de metástasis y una disminución del tiempo libre de enfermedad y la supervivencia global (167). Pero también se relacionan con estos tumores la MMP1, MMP-7, MMP-11, MMP-13 y MMP-14 (168)

En un trabajo publicado por Zhang *“et al”* (169) se demuestra que los niveles elevados de MMP-13 se relacionan con fenotipos de CM más agresivos y con una disminución de la supervivencia global, y concluyen que esta MMP puede ser útil como marcador pronóstico cuando se evalúa junto a Her-2 y al estado de los ganglios axilares.

Respecto a MMP-1 se ha evidenciado su papel esencial en la progresión del cáncer de mama, favoreciendo el crecimiento del tumor primario y el desarrollo de metástasis a distancia (170), lo que condiciona un peor pronóstico y una disminución del tiempo libre de enfermedad.

Gran parte de la actividad de las MMPs se ha investigado en el tumor primario, pero recientemente se ha comenzado a evidenciar la importancia de la expresión de estas enzimas en los ganglios linfáticos axilares (171), especialmente en el ganglio centinela. Como ya hemos mencionado previamente, en el artículo publicado por Eiro *“et al”*, en 2013 (142), se determina la importancia de la expresión de MMP-1 por las células mononucleares del GC. Evidenciando que las pacientes con GC positivos, en las que esta enzima no se expresa, no se objetivan metástasis en los ganglios axilares no centinela una vez realizada la LA, con una sensibilidad y un valor predictivo negativo para la prueba del 100%. Por ello, podemos decir que la expresión de MMP-1 por las células mononucleares inflamatorias del GC, puede considerarse un marcador biológico útil para predecir la progresión de las células tumorales al resto de los ganglios linfáticos axilares.

TABLA 3. Clasificación de las metaloproteasas de matriz humana

| GRUPO | MMP | Nombre común | Sustrato |
|----------------|----------------------------|------------------------------|--|
| COLAGENASAS | MMP-1 | Colagenasa intersticial-1 | Colágenos (I, II, III, VII, VIII y IX), proteoglicanos, agreganos, |
| | MMP-8 | Colagenasa-2 ó de neutrófilo | Colágenos (I, II, III, VII, VIII y X), fibronectina, proteoglicanos. |
| | MMP-13 | Colagenasa-3 | Colágenos (I, II, III, VII, VIII y X), tenascina, plasminógeno, agregano, fibronectina, osteonectina, MMP-9 |
| GELATINASAS | MMP-2 | Gelatinasa-A | Gelatina, colágeno (I, IV, V, VII, X, XI y XIV), elastina, fibronectina |
| | MMP-9 | Gelatinasa-B | Colágenos (IV, V, VII, X y XIV), gelatina, entactina, elastina, fibronectina, osteonectina, plasminógeno, proteoglicanos |
| ESTROMELISINAS | MMP-3 | Estromelisina-1 | Colágenos (IV, V y IX), gelatina, aggrecano, laminina, elastina, caseína, osteonectina |
| | MMP-10 | Estromelisina-2 | Colágenos (I, II, IV y V), gelatina, caseína, elastina, fibronectina |
| | MMP-11 | Estromelisina-3 | Colágenos (IV, V, IX y V), laminina, elastina, fibronectina, caseína, proteoglicanos |
| MATRISILINAS | MMP-7 | Matrisilina | Colágeno IV, gelatina, fibronectina, laminina, elastina, caseína, transferrina |
| | MMP-26 | Matrisilina-2 | Colágeno IV, fibronectina, fibrinógeno, gelatina, pro-MMP-9 |
| MT-MMPs | MMP-14 | MT1-MMP | Colágenos (I, II, III), gelatina, fibronectina, laminina, vitronectina, entactina, pro-MMP-2 |
| | MMP-15 | MT2-MMP | Fibronectina, gelatina, vitronectina, entactina, laminina, pro-MMP-2 |
| | MMP-16 | MT3-MMP | Colágeno III, gelatina, caseína, fibronectina, pro-MMP-2 |
| | MMP-17 | MT4-MMP | Pro-MMP-2, fibrinógeno, gelatina |
| | MMP-24 | MT5-MMP | Fibronectina, pro-MMP-2, proteoglicanos, gelatina |
| | MMP-25 | MT6-MMP | Pro-MMP-2, Pro-MMP-9, colágeno IV, gelatina, fibronectina, proteinasa A |
| OTRAS ENZIMAS | MMP-12 | Elastasa de macrófago | Colágeno IV, gelatina, elastina, caseína, fibronectina, vitronectina, laminina, entactina, fibrina/fibrinógeno |
| | MMP-19, 20, 21, 23, 27, 28 | | |

1. 10 FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN Pit-1/POU1F1

La transcripción es el proceso en que la información codificada en el ADN pasa a ARN mensajero. La síntesis del ARN la realiza la ARN polimerasa, pero para la iniciación y progresión del proceso se necesita la participación de un gran número de proteínas (factores de transcripción) que posibilitan el acoplamiento de la ARN polimerasa al promotor del gen en concreto, favoreciendo la síntesis del mensajero en una cantidad precisa.

Por lo tanto, podemos decir que los factores de transcripción (FT) son proteínas que coordinan y regulan la expresión de un gen o de un grupo de genes. Pueden actuar uniéndose a secuencias concretas de ADN, a otros factores o directamente a la ARN polimerasa (172).

Estos factores presentan una estructura modular formada por ciertos tipos de dominios o regiones, entre los que se encuentran los de unión al ADN y los que regulan la transcripción (región reguladora). La región de unión al ADN permite que el factor se fije específicamente a unos motivos o secuencias breves del ADN, gracias a distintos mecanismos moleculares. La región reguladora permite que la proteína aumente la transcripción (dominio de activación) o la disminuya (dominio de represión) (173).

Uno de los FT cuya expresión se ha encontrado aumentada en el CM ha sido Pit1/POU1F1 (174) (Figura 3)

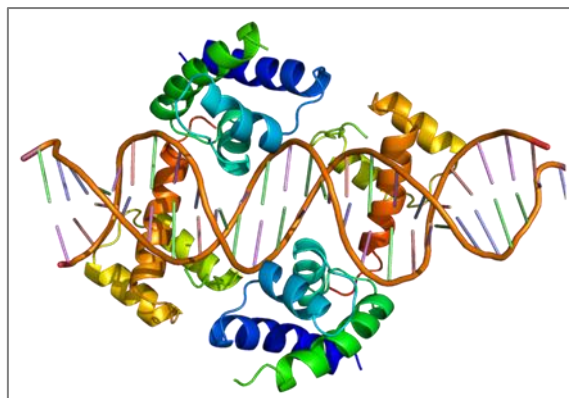


Figura 3. Estructura de Pit-1/POU1F1

Pit-1 pertenece a una familia de proteínas altamente conservadas, que presentan un dominio común denominado POU (175). Este dominio es una región constituida por 155-162 aminoácidos que se divide a su vez en dos regiones: el homedominio POU en la región C-terminal, constituido por 60 aminoácidos y el dominio POU específico (POUs) en la región N-terminal, de tamaño variable (entre 75-82 aminoácidos). Ambas regiones permiten la unión de la proteína al ADN con una elevada afinidad y especificidad. La mitad carboxi-terminal de Pit-1 estaría implicada en la unión al ADN y la mitad amino-terminal sería la responsable de la activación transcripcional (176).

Estas proteínas juegan un papel clave en la inhibición y estimulación de la proliferación celular, así como en la regulación de la migración celular, la supervivencia y la diferenciación terminal (177).

Pit-1 se localiza mayoritariamente en la hipófisis, donde es necesario para la diferenciación celular durante la embriogénesis y la transcripción de la hormona del crecimiento, la prolactina y la subunidad β de la tirotropina (178).

Pero, también se ha comprobado que se expresa en líneas celulares de mama y en la glándula mamaria normal (179). A este nivel, al igual que en la hipófisis, regula la hormona del crecimiento y la prolactina, hormonas que se han considerado pro-tumorales en la mama (180), además de incrementar la proliferación celular, disminuir la apoptosis, e inducir una mayor invasividad, favoreciendo el desarrollo de metástasis a distancia (181).

Como ya hemos comentado previamente, el desarrollo de metástasis en el CM precisa entre otros pasos, de la degradación de las proteínas de la matriz extracelular y de la membrana basal, para permitir que las células tumorales invadan los tejidos adyacentes, proceso que implica la actividad de enzimas proteolíticos, como son las MMPs. Recientemente se ha publicado un trabajo que indica que Pit-1 aumenta la expresión y la actividad de MMP-1 y MMP-13 a través de una regulación transcripcional directa (182).

2. JUSTIFICACIÓN

La biopsia de ganglio centinela se considera en la actualidad la técnica de elección para la estadificación ganglionar en las pacientes diagnosticadas de cáncer de mama con axila clínica y ecográficamente negativa.

Sin embargo, su desarrollo nos ha planteado nuevos interrogantes, tales como definir a ese importante porcentaje de pacientes en las que sólo existe afectación del ganglio centinela (40-70%), en las que se podría evitar una linfadenectomía axilar o cualquier otro tratamiento sobre la axila y sus efectos adversos.

La respuesta a este interrogante puede encontrarse, como publicó Eiró N *"et al"* (142), en la expresión de MMP-1 por las células mononucleares inflamatorias del ganglio centinela. Representando ésta un útil marcador de predicción de la afectación de ganglios no centinela tras la identificación de un ganglio centinela metastásico.

Por tanto, sería conveniente realizar un estudio de validación de estos resultados en una población más amplia de pacientes, de cara a su implantación clínica.

Además se plantea establecer criterios complementarios, de cara a mejorar la sensibilidad del método, mediante la consideración conjunta de parámetros tumorales clásicos (tales como los empleados actualmente en los nomogramas) o la determinación en el ganglio centinela de otros parámetros biológicos, como el factor de transcripción Pit-1, que recientemente se ha relacionado con la expresión tumoral de MMP-1.

3. OBJETIVOS

1. En una amplia población de mujeres con cáncer de mama y axila clínica y ecográficamente negativa, analizar el valor predictivo negativo y positivo, así como la sensibilidad y especificidad de la expresión de MMP-1 por las células mononucleares inflamatorias de los ganglios centinela en el cáncer de mama para predecir la afectación de los ganglios no-centinela.
2. Determinar la posible relación entre la expresión de MMP-1 y Pit-1, en los ganglios centinela positivos de cáncer de mama y su posible influencia sobre la afectación de los ganglios no centinela.
3. Analizar la posible mejora de la sensibilidad y especificidad de la determinación de la expresión de MMP-1 por las células mononucleares inflamatorias de los ganglios centinela, en combinación con parámetros tumorales clásicos, tales como los empleados actualmente en los nomogramas de uso clínico, de cara a la predicción de la afectación de los ganglios no-centinela.
4. Investigar la posible mejora de los valores predictivos negativo y positivo de la determinación de la expresión de MMP-1 por las células mononucleares inflamatorias de los ganglios centinela, en combinación con parámetros tumorales clásicos, tales como los empleados actualmente en los nomogramas de uso clínico, de cara a la predicción de la afectación de los ganglios no-centinela.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Se trata de un estudio observacional de casos y controles en el que se incluyen pacientes diagnosticadas de cáncer de mama infiltrante, sometidas a la técnica de BSGC en las que se detectaron ganglios centinela positivos.

4.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO

Para abordar los objetivos del proyecto, se han incluido dos poblaciones de pacientes. Para los objetivos 1 y 2 se consiguió un grupo I (de validación) en el que se han incluido 97 pacientes sometidas a la técnica de BSGC en la fase terapéutica por cáncer de mama infiltrante, con ganglios centinela positivos y posterior LA, en el Hospital de Cabueñes de Gijón (Área Sanitaria V) entre los años 2003 y 2013, teniendo en cuenta que cumplan unos criterios de inclusión y exclusión, que se describen a continuación.

Con el propósito de abordar los objetivos 3 y 4 al grupo I se sumó un segundo grupo de pacientes, que corresponde al grupo histórico del primer estudio sobre MMP-1 en ganglio centinela de Eiró “et al” (Eur J Cancer, 2013), teniendo en cuenta los mismos criterios de inclusión y exclusión que para el grupo I.

Las características de ambos grupos se describen en la tabla 4.

4.2.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

Las pacientes incluidas en el estudio deben cumplir los siguientes criterios de inclusión:

- Diagnóstico histológico de carcinoma infiltrante de mama, con información bien documentada sobre su diagnóstico histopatológico.
- Haberse sometido a la técnica de biopsia de ganglio centinela en la fase terapéutica.
- Tumores T1 ó T2.
- Tumores sin afectación clínica axilar.

- Ausencia de sospecha de enfermedad metastásica en el momento del diagnóstico inicial.

4.2.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

Las pacientes incluidas en el estudio no deberían cumplir ninguno de los siguientes criterios:

- Pacientes de las que no se disponga de las muestras tisulares de los ganglios linfáticos axilares almacenadas en parafina y en perfecto estado.
- Tumores multicéntricos.
- Cirugía axilar previa.
- Tratamiento con quimioterapia neoadyuvante o radioterapia previa.
- Embarazo o lactancia.
- Biopsia mamaria previa extensa

4.2.3 CARACTERÍSTICAS DE LOS CASOS DE CM, INCLUIDOS EN EL ESTUDIO: Se dividen en 2 grupos: Grupo I (grupo de validación) y Grupo II (grupo histórico), las características de ambos grupos se describen en la tabla 4.

Tabla 4. Características de los casos incluidos en el estudio

| CARACTERÍSTICAS | PACIENTES N(%) | |
|------------------------------|---------------------|-----------------|
| | GRUPO DE VALIDACIÓN | GRUPO HISTÓRICO |
| CASOS TOTALES | 97 | 105 |
| EDAD (años) | | |
| ≤ 53 | 49 (50,5) | 52 (49,52) |
| > 53 | 48 (49,5) | 53 (50,47) |
| MENOPAUSIA | | |
| Premenopaúsica | 39 (40,6) | 23 (21,90) |
| Postmenopaúsica | 58 (59,8) | 82 (78,09) |
| TAMAÑO TUMORAL | | |
| T1 | 67 (69,1) | 62 (59,04) |
| T2 | 30 (30,9) | 43 (40,95) |
| GRADO HISTOLÓGICO | | |
| Bien diferenciado | 22 (22,7) | 26 (24,76) |
| Moderadamente diferenciado | 54 (55,7) | 54 (51,42) |
| Pobremente diferenciado | 18 (18,6) | 25 (23,80) |
| RECEPTORES DE ESTRÓGENOS | | |
| Negativos | 16 (16,5) | 16 (15,23) |
| Positivos | 79 (81,4) | 89 (84,76) |
| RECEPTORES DE PROGESTERONA | | |
| Negativos | 24 (24,7) | 24 (22,85) |
| Positivo | 71 (73,2) | 81 (77,14) |
| Her-2 | | |
| Negativo | 74 (76,3) | 91 (86,66) |
| Positivo | 20 (20,6) | 14 (13,33) |
| INVASIÓN LINFOVASCULAR | | |
| No | 36 (37,1) | 53 (50,47) |
| Sí | 49 (50,5) | 52 (49,52) |
| TAMAÑO DE LA METÁSTASIS (GC) | | |
| Micrometástasis | 15 (15,5) | 30 (28,57) |
| Macrometástasis | 82 (84,5) | 75 (71,42) |

4.3 PROCEDIMIENTO DE BIOPSIA SELECTIVA DE GANGLIO CENTINELA Y SU ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO

La localización del GC se llevó a cabo mediante la inyección de radiotrazador (37-74 MBq de ^{99m}Tc) el día antes de la intervención quirúrgica, a nivel intratumoral, subdérmico o periareolar según el caso.

Tras ésta se realizó en todos los casos una linfogammagrafía (entre 12 y 24 horas antes de la intervención quirúrgica). Se consideró GC cualquiera que presentase un canal linfático visible, o en su defecto el primer ganglio en aparecer en cualquier territorio linfático, o todos los que se identificasen simultáneamente con una intensidad similar). Se consideró ganglio secundario, cualquiera que apareciese posteriormente y con una captación significativamente inferior, en la misma línea de progresión linfática del ganglio identificado como centinela.

Durante la intervención quirúrgica se empleó una gammasonda para la localización y extirpación del GC. Se consideró GC aquél o aquéllos con visualización en la imagen gammagráfica previa y conteo intraoperatorio significativo y superior al menos 10:1 al resto de los ganglios axilares.

Se realizó biopsia intraoperatoria de los GC extirpados.

Para su examen, el ganglio se remitió en fresco al laboratorio de Anatomía Patológica. Se realizó inicialmente un estudio macroscópico del mismo, por parte del patólogo, que posteriormente procedió a su sección, siguiendo su eje longitudinal, en láminas de 2 mm de espesor. Se tomaron muestras citológicas de raspado de cada una de las caras de sección del GC, que fueron teñidas con Hematoxilina-Eosina (HE) (Figura 4). Las secciones obtenidas fueron congeladas a una temperatura de -20°C y se practicaron los cortes histológicos en un criostato.

Se realizaron secciones de 5-10 micras por niveles. En cada nivel se estudiaron 3 cortes teñidos con HE y se reservó uno adicional para tinción inmunohistoquímica (IHQ) con CK AE1/AE3, que se realizó en todos los casos en los que las tinciones de rutina no detectaron metástasis (Figura 5). A continuación, se desechaban 100 micras de tejido y

se realizaban nuevas secciones. El proceso se detenía cuando era detectado tejido tumoral en cualquiera de las secciones teñidas.

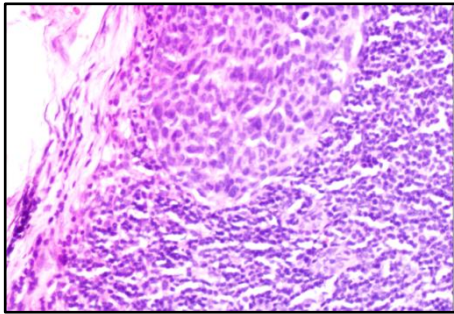


Figura 4. GC positivo por tinción H-E

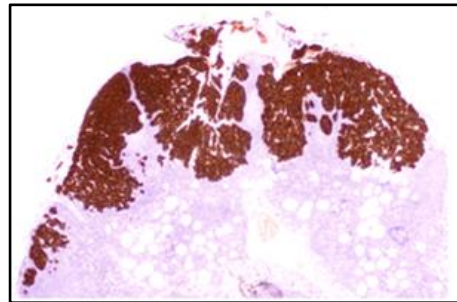


Figura 5. GC positivo por tinción IHQ

En los casos en que se detectaron metástasis en el acto intraoperatorio se procedió a la realización de la LA (niveles I y II). En los casos en que éstas se identificaron de forma diferida en las tinciones de inmunohistoquímica la LA se realizó en un segundo tiempo operatorio.

4.4 MANEJO DE LAS MUESTRAS –TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA

Partimos de los bloques de parafina de los ganglios centinela metastásicos conservados en el Servicio de Anatomía Patológica de los centros participantes en el estudio.

Con la ayuda de un micrótopo (LeicaMicrosystemsGmbH, Wetzlar, Germany) se obtuvieron secciones de 5µm.

Sobre estas secciones se realizó el estudio inmunohistoquímico, utilizando para ello anticuerpos específicos frente a MMP-1 y Pit-1.

Para la inmunotinción se utilizó un inmunoteñidor automático (DAKO AUTOSTAINER). Se trata de un sistema de tinción inmunohistoquímica con software incorporado, que permite la realización de varias tinciones simultáneas, hasta un máximo de 48 portas. Realizamos estos análisis por el método del polímero conjugado (En Vision™ de la casa Dako, Glostrup, Denmark).

4.5 ANALISIS DE LAS TINCIONES

Tanto para MMP-1 como para Pit-1 se determinó la localización de la tinción inmunohistoquímica, el porcentaje de células teñidas y la intensidad de la tinción. En ambos casos se realizó un análisis semicuantitativo, contando para ello con la ayuda de un sistema de análisis de imágenes (análisis-AUTO software de la casa Soft imaging system, Münster, Alemania), incorporado a un microscopio de investigación Olympus BX51 y a un sistema DP12 de captación de imágenes, también de la casa Olympys.

Para ambos factores se evaluó por separado la tinción imnohistoquímica en cada principal tipo celular: Células tumorales y células del estroma intratumoral (células mononucleares inflamatorias y fibroblastos). Se distinguen ambas porque las células cancerosas son de mayor tamaño, mientras que las células mononucleares son pequeñas y redondeadas. Por otro lado, las células cancerosas se disponen formando un patrón acinar o trabecular, mientras que las células mononucleares se encuentran dispersas.

En cada caso, las inmunorreactividades detectadas fueron clasificadas en dos categorías en cada tipo celular, dependiendo del porcentaje de células teñidas:

- Negativo: 0-10% de células positivas
- Positivo: >10% de células positivas

Se consideró una expresión positiva de MMP-1 por las células mononucleares inflamatorias (CMIs) cuando se observó un mínimo de 10% de CMIs peritumorales teñidas.

Para el análisis de las secciones teñidas con el anticuerpo Pit-1, cada sección tumoral fue teñida con el correspondiente anticuerpo y contrastado con hematoxilina. Cada tinción presentaba una diferente densidad óptica, que era captada por el programa.

Cada una de las dos preparaciones histológicas de cada paciente fue analizada con un aumento de 400x, estudiando dos áreas diferentes en cada muestra, seleccionando el programa el área marcada por el anticuerpo que presenta mayor densidad óptica, quedando teñida de rojo, mientras que el área no marcada (fondo) y sólo contrastada con hematoxilina, de menor densidad óptica, quedaba teñida de azul (figura 6).

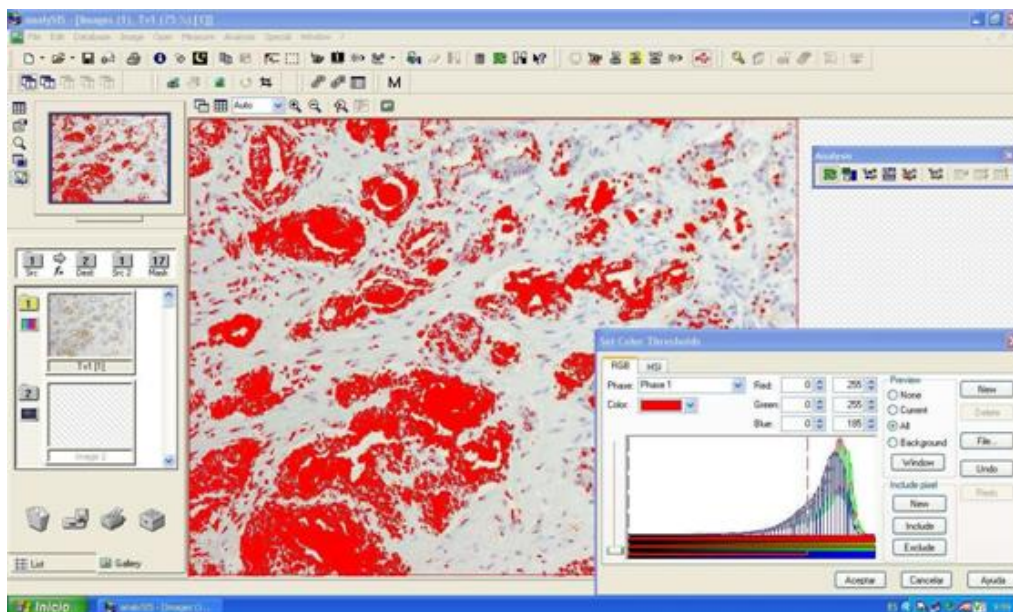


Fig. 6 Programa específico que calcula automáticamente el porcentaje de células inmunoteñidas

De cada campo se obtuvo un porcentaje, resultante de dividir el área teñida entre el área no teñida, y se obtuvo una media final entre las dos áreas analizadas del cilindro. Para evaluar la intensidad de la tinción se usó una puntuación con intervalo de 0 a 3, donde 0 correspondía a no tinción, 1 tinción débil, 2 tinción moderada y 3 tinción intensa. Este valor de la intensidad se multiplicó por el porcentaje de células teñidas, obtenido con el programa informático para darnos una puntuación final de 0 a 300 para cada preparación histológica.

4.6 ANÁLISIS DE DATOS Y MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Las diferencias en los porcentajes fueron evaluadas por el método X^2 . Los valores de inmunotinción para cada proteína se expresaron como mediana (intervalo).

La comparación de los valores de inmunotinción entre grupos se realizó con los test de Mann-Whitney o Kruskal-Wallis, aplicando la corrección de Bonferrini.

Se usó para todos los cálculos el software PASW statistics 18.0 programme (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Se consideró como significativa una $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA PARA LA MMP-1 EN LOS GANGLIOS CENTINELA METASTÁSICOS

La figura 7 muestra ejemplos representativos de tinciones inmunohistoquímicas para la MMP-1 en los ganglios centinela metastásicos.

La inmunotinción para esa proteína tuvo una localización citoplasmática en todos los casos positivos. Las células tumorales y las células mononucleares adyacentes a ellas fueron los tipos celulares que mostraron la expresión de MMP-1 en los casos positivos. De acuerdo con un estudio previo, y de cara a los objetivos de la presente tesis doctoral, consideramos como casos positivos para la MMP-1 en el ganglio centinela, aquellos en que la tinción inmunohistoquímica para la proteína, se localiza en las células mononucleares inflamatorias, inmediatamente adyacentes a las células cancerosas de los “nidos” tumorales del ganglio centinela.

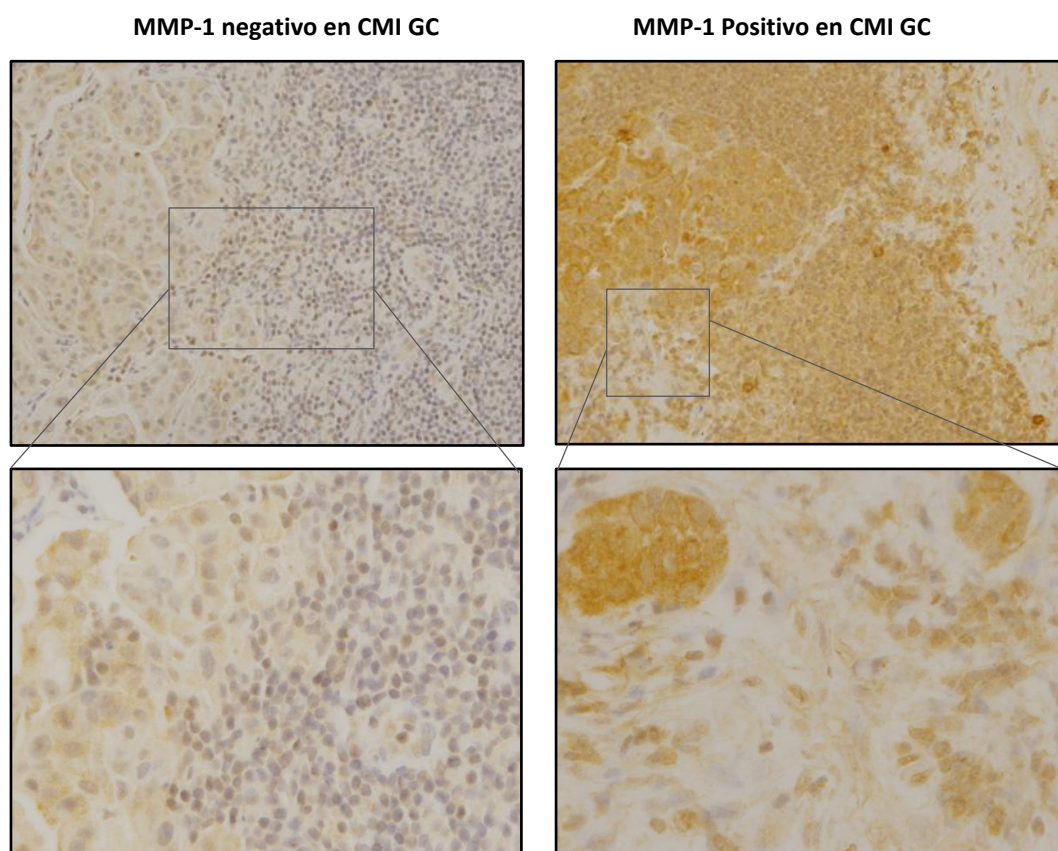


Fig 7. Ejemplo de tinción inmunohistoquímica para MMP-1 en ganglio centinela positivo

5.2. RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE MMP-1 EN LOS GANGLIOS CENTINELA Y LA AFECTACIÓN NEOPLÁSICA DE LOS GANGLIOS NO CENTINELA.

De todos los ganglios centinela metastásicos analizados, correspondientes a sendos pacientes, un total de 68 (70,1%) fueron positivos para la MMP-1.

La Tabla 5 muestra la relación entre la expresión de MMP-1 por los ganglios centinela y la afectación neoplásica de los ganglios no centinela.

Como se puede apreciar en dicha tabla, existió una asociación significativa entre esos parámetros. La expresión de MMP-1 se asoció con la afectación neoplásica de los ganglios no centinela.

Tabla 5. Relación entre la expresión de MMP-1 por los ganglios centinela y la afectación neoplásica de los ganglios no centinela

| | No afectación en ganglios no centinela | Afectación en ganglios no centinela | TOTAL | VALOR P |
|----------------|--|-------------------------------------|-------|---------------|
| MMP-1 negativa | 29 | 0 | 29 | 0,0001 |
| MMP-1 positiva | 24 | 44 | 68 | |
| TOTAL | 53 | 44 | 97 | |

5.3 SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD, VALOR PREDICTIVO NEGATIVO Y POSITIVO DE LA EXPRESIÓN DE MMP-1 EN EL GANGLIO CENTINELA METASTÁSICO PARA PREDECIR LA AFECTACIÓN DE LOS GANGLIOS NO CENTINELA

Nuestros resultados demuestran que la expresión de MMP-1 por las células mononucleares en los ganglios centinela tiene una sensibilidad del 100%, un valor

predictivo negativo del 100%, un valor predictivo positivo del 64,71% y una especificidad del 54,72% para predecir el estado de los ganglios no centinela.

5.4 RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE MMP-1 EN EL GANGLIO CENTINELA METASTÁSICO Y LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLOGICAS DE LOS PACIENTES Y DE SUS TUMORES

Para la evaluación de estas relaciones hemos considerado no sólo los casos incluidos originalmente en el presente estudio, sino también la serie de casos publicada por Eiró “et al” en Eur. J. Cancer (142).

La tabla 6 muestra la relación entre la expresión de MMP-1 por los ganglios centinela metastásicos y características de los pacientes, como la edad y el estado menopáusicos, así como características de los tumores, como son el tamaño tumoral, el grado histológico, los receptores de estrógenos y progesterona, el estado HER-2, la invasión linfovascular y el tamaño de las metástasis en el GC.

Tabla 6. Relación entre la expresión de MMP-1 por los ganglios centinela metastásicos y las características clínico-patológicas de los pacientes y sus tumores

| CARACTERÍSTICAS CLÍNICO PATOLÓGICAS | EXPRESIÓN DE MMP-1 por las CMI del GC | | VALOR de P |
|---|---------------------------------------|--|------------|
| | NO N (%) | SÍ N (%) | |
| EDAD (mediana años) ≤ 56 > 56 | 42 (20,89) 27 (13,43) | 62 (30,84) 70 (34,82) | 0,085 |
| MENOPAUSIA Premenopáusica Postmenopáusica | 23 (11,44) 46 (22,88) | 39 (19,40) 93 (46,26) | 0,696 |
| TAMAÑO TUMORAL T1 T2 | 47 (23,61) 22 (11,05) | 78 (39,19) 52 (26,13) | 0,232 |
| GRADO HISTOLÓGICO Bien diferenciado Moderadamente diferenciado Pobremente diferenciado | 21 (10,71) 38 (19,38) 7 (3,57) | 26 (13,26) 69 (35,20) 35 (17,85) | 0,017 |
| R.E. Negativos Positivos | 12 (6,09) 54 (27,41) | 19 (9,64) 112 (56,85) | 0,644 |
| R.P. Negativos Positivos | 15 (7,61) 51 (25,88) | 32 (16,24) 99 (50,25) | 0,931 |
| Her-2 Negativo Positivo | 57 (28,78) 10 (5,05) | 108 (54,54) 23 (11,61) | 0,788 |
| INVSIÓN LINFÁTICA No Sí | 35 (18,51) 31 (16,40) | 53 (28,04) 70 (37,03) | 0,249 |
| TIPO de METÁSTASIS (GC) Micrometástasis Macrometástasis | 25 (12,37) 44 (21,78) | 20 (9,90) 113 (55,94) | 0,001 |

Como se puede observar en esta tabla, la expresión de MMP-1 por las CMIs de los GC metastásicos no se asoció con la edad de las pacientes, la menopausia, el tamaño tumoral, la expresión de receptores de estrógenos ni de progesterona, el Her-2 ni la invasión linfática. Sin embargo, encontramos una asociación significativa entre dicha expresión tumoral y el tipo de metástasis ($p=0,0001$) y con el grado de diferenciación del tumor primario ($p= 0,017$).

5.5 ANÁLISIS DE LAS POSIBLES COMBINACIONES ENTRE LA EXPRESIÓN DE MMP-1 EN LOS GANGLIOS CENTINELA METASTÁSICOS Y LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE LOS PACIENTES DE CARA A MEJORAR LA PREDICCIÓN DE AFECTACIÓN DE LOS GANGLIOS NO CENTINELA

Con objeto de incrementar el valor predictivo de la expresión de MMP-1 en los casos con ganglio centinela positivo para la expresión de MMP1, hemos evaluado el posible efecto positivo de combinarla con las características clínico-patológicas de los pacientes y sus tumores.

Las tablas 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15 muestran el valor de esas posibles combinaciones con los diferentes factores clínico-patológicos de cara a predecir la afectación de los ganglios no centinela en los casos de ganglio centinela positivos para la MMP-1.

En aquellos parámetros en que el valor de P fue menor de 0,05 (o próximo a 0,05) analizamos la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo, de la prueba.

Tabla 7. Relación entre la edad de las pacientes y la afectación de los ganglios no centinela en los casos con ganglio centinela metastásico positivo para la MMP1

| MEDIANA EDAD DE LOS PACIENTES | CASOS CON GANGLIOS NO CENTINELA NEGATIVOS N (%) | CASOS CON GANGLIOS NO CENTINELA POSITIVOS N (%) | Nº TOTAL DE CASOS N (%) | VALOR de P |
|-------------------------------|--|--|----------------------------|------------|
| ≤ 56 años | 27 (20,45) | 35 (26,51) | 62 (46,96) | 0,152 |
| > 56 años | 21 (15,90) | 49 (37,12) | 70 (53,03) | |
| TOTAL | 48 (36,36) | 84 (63,63) | 132 (100) | |

Tabla 8. Relación entre el estado menopáusico de las pacientes y la afectación de los ganglios no centinela en los casos con ganglio centinela metastásico positivo para la MMP1

| MENOPAUSIA | CASOS CON GANGLIOS NO CENTINELA NEGATIVOS N (%) | CASOS CON GANGLIOS NO CENTINELA POSITIVOS N (%) | Nº TOTAL DE CASOS N (%) | VALOR de P |
|------------|--|--|----------------------------|------------|
| NO | 17 (12,87) | 22 (16,66) | 39 (29,54) | 0,358 |
| SÍ | 31 (23,48) | 62 (46,96) | 93 (70,45) | |
| TOTAL | 48 (36,36) | 84 (63,63) | 132 (100) | |

Tabla 9. Relación entre el tamaño tumoral y la afectación de los ganglios no centinela en los casos con ganglio centinela metastásico positivo para la MMP1

| TAMAÑO TUMORAL | CASOS CON GANGLIOS NO CENTINELA NEGATIVOS N (%) | CASOS CON GANGLIOS NO CENTINELA POSITIVOS N (%) | Nº TOTAL DE CASOS N (%) | VALOR de P |
|----------------|--|--|----------------------------|------------|
| T1 | 34 (26,15) | 44 (33,84) | 78 (60) | 0,054 |
| T2 | 13 (10) | 39 (30) | 52 (40) | |
| TOTAL | 47 (36,15) | 83 (63,84) | 132 (100) | |

Tabla 10. Relación entre la expresión de receptores estrogénicos por inmunohistoquímica y la afectación de los ganglios no centinela en los casos con ganglio centinela metastásico positivo para la MMP1

| EXPRESIÓN DE RECEPTORES ESTROGÉNICOS | CASOS CON GANGLIOS NO CENTINELA NEGATIVOS N (%) | CASOS CON GANGLIOS NO CENTINELA POSITIVOS N (%) | Nº TOTAL DE CASOS N (%) | VALOR de P |
|--------------------------------------|--|--|----------------------------|------------|
| NO | 6 (4,58) | 13 (9,92) | 19 (14,50) | 0,812 |
| SÍ | 42 (32,06) | 70 (53,43) | 112 (85,49) | |
| TOTAL | 48 (36,64) | 83 (63,35) | 131 (100) | |

Tabla 11. Relación entre la expresión de receptores de progesterona por inmunohistoquímica y la afectación de los ganglios no centinela en los casos con ganglio centinela metastásico positivo para la MMP1

| EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE PROGESTERONA | CASOS CON GANGLIOS NO CENTINELA NEGATIVOS N (%) | CASOS CON GANGLIOS NO CENTINELA POSITIVOS N (%) | Nº TOTAL DE CASOS N (%) | VALOR de P |
|---|--|--|----------------------------|------------|
| NO | 9 (6,87) | 23 (17,55) | 32 (24,42) | 0,348 |
| SÍ | 39 (29,77) | 60 (45,80) | 99 (75,57) | |
| TOTAL | 48 (36,64) | 83 (63,35) | 131 (100) | |

Tabla 12. Relación entre la expresión de C-erb-2 y la afectación de los ganglios no centinela en los casos con ganglio centinela metastásico positivo para la MMP1

| EXPRESIÓN DE C-erb-2 | CASOS CON GANGLIOS NO CENTINELA NEGATIVOS N (%) | CASOS CON GANGLIOS NO CENTINELA POSITIVOS N (%) | Nº TOTAL DE CASOS N (%) | VALOR de P |
|----------------------|--|--|----------------------------|------------|
| NO | 44 (33,58) | 64 (48,85) | 108 (82,44) | 0,061 |
| SÍ | 4 (3,05) | 19 (14,50) | 23 (17,55) | |
| TOTAL | 48 (36,64) | 83 (63,35) | 131 (100) | |

Tabla 13. Relación entre la invasión linfática y la afectación de los ganglios no centinela en los casos con ganglio centinela metastásico positivo para la MMP1

| INVASIÓN LINFÁTICA | CASOS CON GANGLIOS NO CENTINELA NEGATIVOS N (%) | CASOS CON GANGLIOS NO CENTINELA POSITIVOS N (%) | Nº TOTAL DE CASOS N (%) | VALOR de P |
|--------------------|--|--|----------------------------|------------|
| NO | 27 (21,95) | 26 (21,13) | 53 (43,08) | 0,012 |
| SÍ | 19 (1,44) | 51 (41,46) | 70 (56,91) | |
| TOTAL | 46 (37,39) | 77 (62,60) | 131 (100) | |

Tabla 14. Relación entre el estadio histológico y la afectación de los ganglios no centinela en los casos con ganglio centinela metastásico positivo para la MMP1

| ESTADÍO HISTOLÓGICO | CASOS CON GANGLIOS NO CENTINELA NEGATIVOS N (%) | CASOS CON GANGLIOS NO CENTINELA POSITIVOS N (%) | Nº TOTAL DE CASOS N (%) | VALOR de P |
|---------------------------|--|--|----------------------------|------------|
| BIEN DIFERENCIADO | 15 (11,53) | 11 (8,46) | 26 (20) | 0,033 |
| MODERDAMENTE DIFERENCIADO | 20 (15,38) | 49 (37,69) | 69 (53,07) | |
| POBREMENTE DIFERENCIADO | 12 (9,23) | 23 (17,69) | 35 (26,92) | |
| TOTAL | 47 (36,15) | 83 (63,84) | 132 (100) | |

Tabla 15. Relación entre el tipo de metástasis en el GC y la afectación de los ganglios no centinela en los casos con ganglio centinela metastásico positivo para la MMP1

| TIPO DE METÁSTASIS EN GC | CASOS CON GANGLIOS NO CENTINELA NEGATIVOS N (%) | CASOS CON GANGLIOS NO CENTINELA POSITIVOS N (%) | Nº TOTAL DE CASOS N (%) | VALOR de P |
|--------------------------|--|--|----------------------------|------------|
| MICROMETÁSTASIS | 11 (8,33) | 9 (6,81) | 20 (15,15) | 0,115 |
| MACROMETÁSTASIS | 38 (28,78) | 74 (56,06) | 112 (84,84) | |
| TOTAL | 49 (37,12) | 83 (62,87) | 132 (100) | |

Como se puede apreciar en estas tablas, parámetros clínico-patológicos como la edad, la expresión de receptores de estrógenos y progesterona, la expresión de Her-2 y el tipo de metástasis, no mostraron valor de cara a mejorar la predicción de afectación neoplásica de los ganglios no centinela. Sin embargo, el estadio histológico y la invasión linfática pueden ayudar a mejorar dicha predicción.

Respecto al tamaño tumoral el valor de P se aproximó mucho a 0,05, por lo que podría considerarse también, como un parámetro a tener en cuenta, de cara a predecir el estado de los ganglios no centinela.

En estos últimos tres parámetros analizamos la sensibilidad, la especificidad, el VPN y VPP de la prueba.

- TAMAÑO TUMORAL: Sensibilidad: 46,99%. Especificidad: 72,34. VPP: 75%.
VPN:43,59%
- INVASIÓN LINFÁTICA: Sensibilidad: 66,23%. Especificidad: 58,70%. VPP: 72,86%.
VPN: 50,94%
- ESTADIO HISTOLÓGICO: Sensibilidad: 60,43%. Especificidad: 53,64%. VPP:
67,47%. VPN: 48,12%

Como vemos en el primero mejora la especificidad, respecto a la obtenida al analizar la relación entre la expresión de MMP-1 por las CMI del GC y la afectación de los ganglios no centinela, sin embargo disminuye mucho la sensibilidad y el VPN.

En los otros 2 parámetros analizados no se objetivan mejoras significativas en la especificidad ni el VPP y sí un descenso importante de la sensibilidad y el VPN.

5.6 TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA PARA Pit-1 POR LOS GANGLIOS CENTINELA METASTÁSICOS

En un total de 62 casos evaluamos la expresión de Pit-1, ya que la expresión de este factor de transcripción en un estudio previo se asoció con la expresión de MMP-1 en células agresivas de cáncer de mama (182).

La figura 8 muestra ejemplos de tinciones inmunohistoquímicas para Pit-1 en los ganglios centinela metastásicos.

En todos los casos positivos se evidenció inmunotinción de localización citoplasmática en las células cancerosas, los fibroblastos y las células mononucleares adyacentes, para dicha proteína.

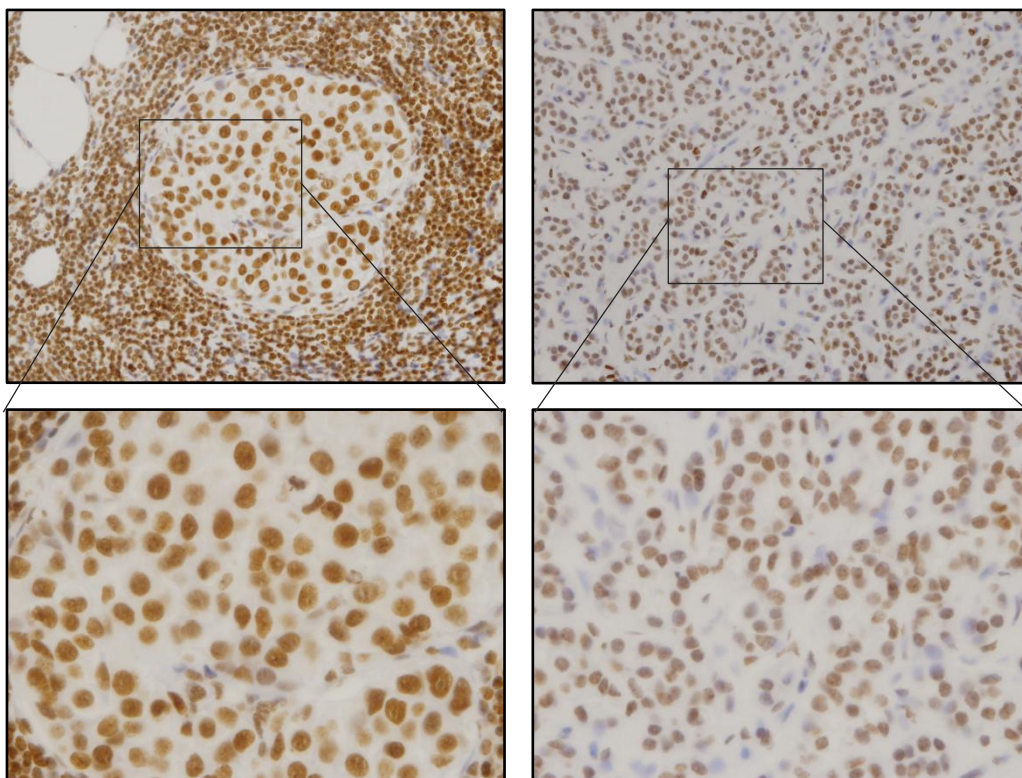


Figura 8. Ejemplo de tinción inmunohistoquímica para Pit-1 en ganglios centinela metastásicos.

5.7 ANÁLISIS DE LOS VALORES DE TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA PARA Pit-1 EN LOS GANGLIOS CENTINELA METASTÁSICOS

La tinción inmunohistoquímica para el factor de transcripción Pit-1 en los ganglios centinela metastásicos mostró una amplia variabilidad de los valores de score determinados para cada uno de los casos, con una mediana de 87,34 y un intervalo de 0 a 247,5.

Las figuras 9 y 10 muestran la distribución de los valores de score para pit-1 en los ganglios centinela metastásicos, según la expresión de la MMP-1 por las CMI.

En los casos sin expresión de MMP-1 por las CMI (22 casos) la mediana del score de Pit-1 es de 133,85, con un intervalo de 0 a 192. En los casos con expresión de MMP-1 por las CMI (40 casos), la mediana del score de Pit-1 es de 76,9, con un intervalo de 0 a 247,50.

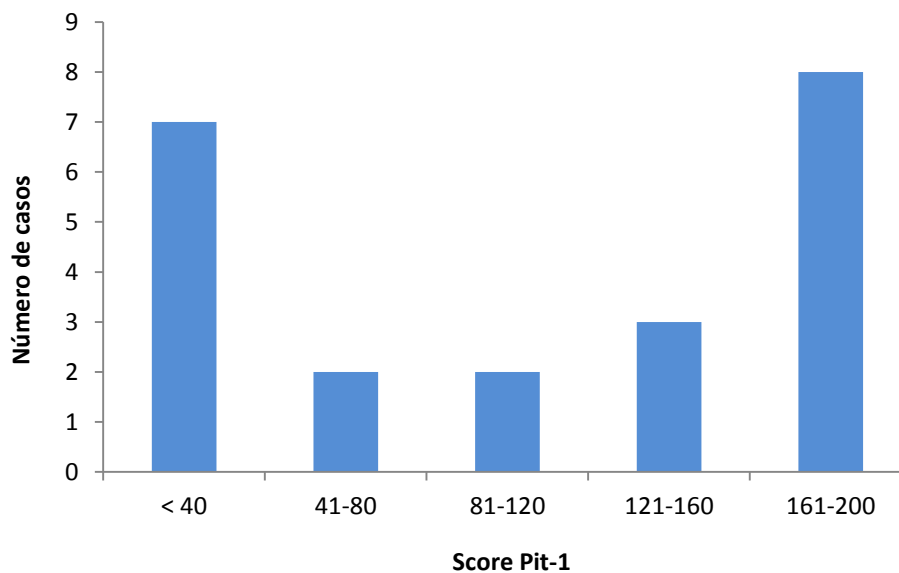


Figura 9. Distribución de los valores de Pit-1 en GC metastásico sin expresión de MMP-1

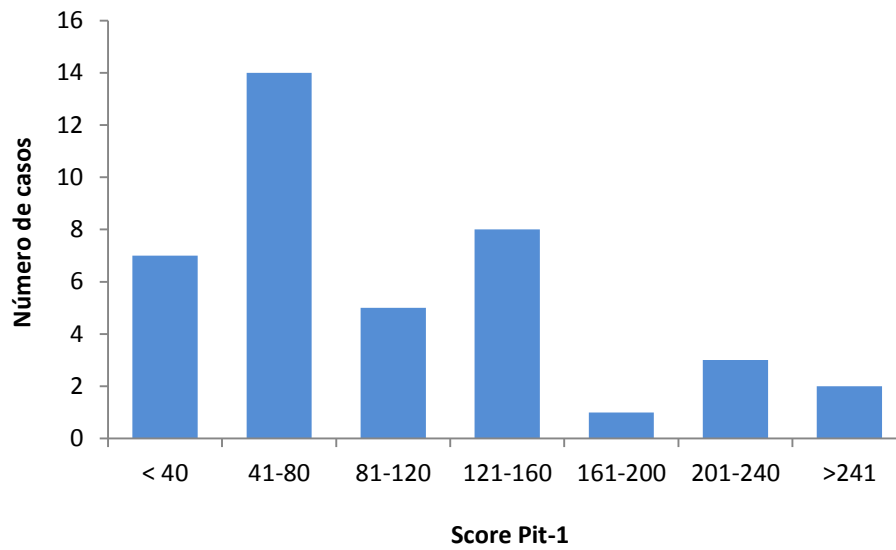


Figura 10. Distribución de los valores de Pit-1 en GC metastásico con expresión de MMP-1

5.8 RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE Pit-1 EN LOS GANGLIOS CENTINELA METASTÁSICOS Y LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE LOS PACIENTES Y DE SUS TUMORES.

La tabla 16 muestra la relación entre el score de Pit-1 y las características clínico-patológicas de los pacientes y de sus tumores. Como se puede observar en dicha tabla no se objetivó ninguna relación estadísticamente significativa entre dichos parámetros y el score de Pit-1.

Tabla 16. Relación entre Score de Pit-1 y las características clínico-patológicas de los pacientes y sus tumores

| CARACTERÍSTICAS CLÍNICO PATOLÓGICAS | Score Pit-1 (expresión global) | | VALOR de P |
|---|--------------------------------------|--------------------------------------|------------|
| | Inferior a la mediana ≤ 87,34 (%) | Inferior a la mediana ≤ 87,34 (%) | |
| EDAD (años) ≤ 54 > 54 | 17 (27,4%) 14 (22,6%) | 16 (25,8) 15 (24,2%) | 1,000 |
| MENOPAUSIA Premenopáusica Postmenopáusica | 13 (21%) 18 (29%) | 11 (17,7%) 20 (32,3%) | 0,794 |
| TAMAÑO TUMORAL T1 T2 | 24 (38,7%) 7 (11,3%) | 23 (37,1%) 8 (12,9%) | 1,000 |
| GRADO HISTOLÓGICO Bien diferenciado Moderadamente diferenciado Pobrememente diferenciado | 0 (0%) 21 (34,4%) 10 (16,4%) | 2 (3,3%) 23 (37,7%) 5 (8,2%) | 0,154 |
| R.E. Negativos Positivos | 7 (11,7%) 24 (40%) | 4(6,7%) 25 (41,7%) | 0,586 |

| | | | |
|--|-------------------------|------------------------|-------|
| R.P. Negativos Positivos | 9 (15%) 22 (36,7%) | 6 (10%) 23 (38,3%) | 0,655 |
| Her-2 Negativo Positivo | 24 (40%) 7 (11,7%) | 21 (35%) 8 (13,3%) | 0,881 |
| TIPO de METÁSTASIS (GC) Micrometástasis Macrometástasis | 4 (6,5%) 27 (43,5 %) | 6 (9,7%) 25 (40,3%) | 0,730 |

En la tabla 17 se muestra la relación entre la expresión de Pit-1 por cada tipo celular y las características clínico-patológicas de las pacientes y sus tumores. En este caso tampoco encontramos ninguna relación estadísticamente significativa entre dichos parámetros.

Tabla 17. Relación entre el Score de Pit-1 por cada tipo celular y las características clínico-patológicas de las pacientes y sus tumores.

| CARACTERÍSTICAS CLÍNICO PATOLÓGICAS | Células Tumorales Pit-1 GC | | | CMI Pit-1 GC | | | Fibroblastos Pit-1 GC | | |
|--|--------------------------------|--------------------------------------|---------|---------------------------------|--------------------------------------|---------|--------------------------------------|--------------------------------|---------|
| | Negativo | Positivo | Valor p | Negativo | Positivo | Valor p | Negativo | Positivo | Valor p |
| EDAD (años) ≤ 54 > 54 | 5 (8,1%) 3 (4,8%) | 28 (45,2%) 26 (41,9%) | 0,854 | 8 (12,9%) 7 (11,3%) | 25 (40,3%) 22 (35,5%) | 1,000 | 31 (50%) 26 (41,9%) | 2 (3,2%) 3 (4,8%) | 0,880 |
| MENOPAUSIA Premenopáusica Postmenopáusica | 3 (4,8%) 5 (8,1%) | 21 (33,9%) 33 (53,2%) | 1,000 | 4 (6,5%) 11 (17,7%) | 20 (32,3%) 27 (43,5%) | 0,426 | 22 (35,5%) 35 (56,5%) | 2 (3,2%) 3 (4,8%) | 1,000 |
| TAMAÑO TUMORAL T1 T2 | 6 (9,7%) 2 (3,2%) | 41 (66,1%) 13 (21%) | 1,000 | 11 (17,7%) 4 (6,5%) | 36 (58,1%) 11 (17,7%) | 1,000 | 42 (67,7%) 15 (24,2%) | 5 (8,1%) 0 (0%) | 0,440 |
| GRADO HISTOLÓGICO Bien diferenciado Mod. diferenciado Pobr. diferenciado | 0 (0%) 5 (8,2%) 3 (4,9%) | 2 (3,3%) 39 (63,9%) 12 (19,7%) | 0,593 | 0 (0%) 10 (1,4%) 5 (8,2%) | 2 (3,3%) 34 (55,7%) 10 (16,4%) | 0,508 | 1 (1,6%) 40 (65,6%) 15 (24,6%) | 1 (1,6%) 4 (6,6%) 0 (0%) | 0,049 |
| R.E. Negativos Positivos | 2 (3,3%) 5 (8,3%) | 9 (15%) 44 (73,3%) | 0,822 | 5 (8,3%) 9 (15%) | 6 (10%) 40 (66,7%) | 0,127 | 11 (18,3%) 44 (73,3%) | 0 (0%) 5 (8,3%) | 0,615 |
| R.P. Negativos Positivos | 2 (3,3%) 5 (8,3%) | 13 (21,7%) 40 (66,7%) | 1,000 | 8 (3,3%) 6 (10%) | 7 (11,7%) 39 (65%) | 0,005 | 15 (25%) 40 (6,7%) | 0 (0%) 5 (8,3%) | 0,418 |
| Her-2 Negativo Positivo | 5 (8,3%) (3,3%) | 40 (66,7%) 13 (21,7%) | 1,000 | 13 (21,7%) 1 (1,7%) | 32 (53,3%) 14 (23,3%) | 0,159 | 40 (66,7%) 15 (25%) | 5 (8,3%) 0 (0%) | 0,418 |
| TIPO METÁSTASIS (GC) Micrometástasis Macrometástasis | 1 (1,6%) 7 (11,3%) | 9 (14,5%) 45 (72,6%) | 1,000 | 1 (1,6%) 14 (22,6%) | 9 (14,5%) 38 (61,3%) | 0,459 | 8 (12,9%) 49 (79%) | 2 (3,2%) 3 (4,8%) | 0,379 |

5.9 RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE Pit-1 EN LOS GANGLIOS CENTINELA METASTÁSICOS Y LA AFECTACIÓN DE LOS GANGLIOS NO CENTINELA

Como se aprecia en la tabla 18, no existió una asociación significativa entre la expresión global de Pit-1 y la afectación tumoral de los ganglios no centinela.

Tabla 18. Relación entre el Score de Pit-1 (valor en relación a la mediana) y la afectación de los ganglios no centinela

| | | Mediana Score Pit-1 | | TOTAL | VALOR de P |
|----------------------------------|----|---------------------|------------|------------|------------|
| | | ≥ 87,34 | < 87,34 | | |
| AFECTACIÓN GANGLIOS NO CENTINELA | NO | 14 (22,6%) | 15 (24,2%) | 29 (46,8%) | 1,000 |
| | SÍ | 17 (27,4%) | 16 (25,8%) | 33 (53,2%) | |
| TOTAL | | 31 (50%) | 31 (50%) | 62 (100%) | |

Asimismo, tampoco se observó relación entre la expresión de Pit-1 por cada tipo celular y la afectación de los ganglios no centinela, como se muestra en las tablas 19, 20 y 21.

Tabla 19. Relación entre la expresión de Pit-1 por las células tumorales y la afectación de los ganglios no centinela

| | | Expresión Pit-1 Células tumorales GC | | TOTAL | VALOR de P |
|----------------------------------|----|--------------------------------------|------------|------------|------------|
| | | 0 | 1 | | |
| AFECTACIÓN GANGLIOS NO CENTINELA | NO | 3 (4,8%) | 26 (41,9%) | 29 (46,8%) | 0,854 |
| | SÍ | 5 (8,1%) | 28 (45,2%) | 33 (53,2%) | |
| TOTAL | | 8 (12,9%) | 54 (87,1%) | 62 (100%) | |

Tabla 20. Relación entre la expresión de Pit-1 por las CMI y la afectación de los ganglios no centinela

| | | Expresión Pit-1 CMI GC | | TOTAL | VALOR de P |
|--|----|------------------------|------------|------------|------------|
| | | 0 | 1 | | |
| AFECTACIÓN GANGLIOS NO CENTINELA | NO | 8 (12,9%) | 21 (33,9%) | 29 (46,8%) | 0,774 |
| | SÍ | 7 (11,3%) | 26 (41,9%) | 33 (53,2%) | |
| TOTAL | | 15 (24,2%) | 47 (75,8%) | 62 (100%) | |

Tabla 21. Relación entre la expresión de Pit-1 por los fibroblastos y la afectación de los ganglios no centinela

| | | Expresión Pit-1 Fibroblastos GC | | TOTAL | VALOR de P |
|--|----|---------------------------------|----------|------------|------------|
| | | 0 | 1 | | |
| AFECTACIÓN GANGLIOS NO CENTINELA | NO | 25 (40,3%) | 4 (6,5%) | 29 (46,8%) | 0,278 |
| | SÍ | 32 (51,6%) | 1 (1,6%) | 33 (53,2%) | |
| TOTAL | | 57 (91,9%) | 5 (8,1%) | 62 (100%) | |

5.10 RELACIÓN ENTRE LAS EXPRESIONES DE MMP-1 POR LAS CMIs Y Pit-1 EN LOS GANGLIOS CENTINELA METASTÁSICOS

Como se puede apreciar en la tabla 22, no se objetivó una relación estadísticamente significativa entre el Score de Pit-1 (valor en relación a la mediana) y la expresión global de MMP-1 por las CMI en los ganglios centinela metastásicos.

Como se aprecia en las tablas 23, 24 y 25, tampoco se objetivó una asociación significativa entre la expresión global de Pit-1 por los diferentes tipos celulares del ganglio centinela metastásico (célula tumoral, CMI y fibroblastos) y la expresión de MMP-1 por las CMI del GC metastásico.

Tabla 22. Relación entre el Score de Pit-1 (valor en relación a la mediana) y la expresión de MMP-1 por las CMI de los ganglios centinela metastásicos

| | | Mediana Score Pit-1 | | TOTAL | VALOR de P |
|------------------------|----|---------------------|----------|------------|------------|
| | | ≤ 87,34 | > 87,34 | | |
| EXPRESIÓN MMP-1 por GC | NO | 9 (14,5%) | 13 (21%) | 22 (35,5%) | 0,426 |
| | SÍ | 22 (35,5%) | 18 (29%) | 40 (64,5%) | |
| TOTAL | | 31 (50%) | 31 (0%) | 62 (100%) | |

Tabla 23. Relación entre la expresión de MMP-1 por las células mononucleares y la expresión global de Pit-1 por las células tumorales del GC metastásico

| | | Expresión Pit-1 Células tumorales GC | | TOTAL | VALOR de P |
|------------------------|----|--------------------------------------|------------|------------|------------|
| | | No | Sí | | |
| EXPRESIÓN MMP-1 por GC | NO | 5 (8,1%) | 17 (27,4%) | 22 (35,5%) | 0,188 |
| | SÍ | 3 (4,8%) | 37 (59,7%) | 40 (64,5%) | |
| TOTAL | | 8 (12,9%) | 54 (87,1%) | 62 (100%) | |

Tabla 24. Relación entre la expresión de MMP-1 por las células mononucleares y la expresión global de Pit-1 por las células tumorales del GC metastásico

| | | Expresión Pit-1 CMI GC | | TOTAL | VALOR de P |
|------------------------|----|------------------------|------------|------------|------------|
| | | No | Sí | | |
| EXPRESIÓN MMP-1 por GC | NO | 4 (6,5%) | 18 (29%) | 22 (35,5%) | 0,610 |
| | SÍ | 11 (17,7%) | 29 (46,8%) | 40 (64,5%) | |
| TOTAL | | 15 (24,2%) | 47 (75,8%) | 62 (100%) | |

Tabla 25. Relación entre la expresión de MMP-1 por las células mononucleares y la expresión global de Pit-1 por las células tumorales del GC metastásico

| | | Expresión Pit-1 Fibroblastos GC | | TOTAL | VALOR de P |
|------------------------|----|---------------------------------|----------|------------|------------|
| | | No | Sí | | |
| EXPRESIÓN MMP-1 por GC | NO | 20 (32,3%) | 2 (3,2%) | 22 (35,5%) | 1,000 |
| | SÍ | 37 (59,7%) | 3 (4,8%) | 40 (64,5%) | |
| TOTAL | | 57 (91,9%) | 5 (8,1%) | 62 (100%) | |

Por otra parte, también evaluamos si la combinación entre las expresiones de ambos factores podría incrementar el valor predictivo de la afectación de los ganglios no centinela, en los casos con ganglio centinela metastásico y con MMP-1 positiva. Sin embargo, como se puede apreciar en las tablas 26, 27 y 28, la combinación de ambos factores no mostró ningún beneficio predictivo.

Tabla 26. Combinación entre la expresión de MMP-1 positiva y Pit-1 por las CMI del GC y la afectación de los ganglios no centinela

| | Afectación Ganglios no centinela | | TOTAL | VALOR de P |
|---|----------------------------------|----------|------------|------------|
| | No | Sí | | |
| Expresión de MMP-1 positiva y Pit-1 negativa por las CMI GC | 7 (17,5%) | 4 (10%) | 11 (27,5%) | 0,270 |
| Expresión de MMP-1 positiva y Pit-1 positiva por las CMI GC | 11 (27,5%) | 18 (45%) | 29 (72,5%) | |
| TOTAL | 18 (45%) | 22 (55%) | 40 (100%) | |

Tabla 27. Combinación entre la expresión de MMP-1 positiva por las CMI del GC y Pit-1 por las células tumorales del GC y la afectación de los ganglios no centinela

| | Afectación Ganglios no centinela | | TOTAL | VALOR de P |
|--|----------------------------------|----------|------------|------------|
| | No | Sí | | |
| Expresión de MMP-1 + por las CMI GC y Pit-1 - por las células tumorales GC | 1 (2,5%) | 2 (5%) | 3 (7,5%) | 1,000 |
| Expresión de MMP-1 + por las CMI GC y Pit-1 + por las células tumorales GC | 17 (42,5%) | 20 (50%) | 37 (92,5%) | |
| TOTAL | 18 (45%) | 22 (55%) | 40 (100%) | |

Tabla 28. Combinación entre la expresión de MMP-1 positiva por las CMI del GC y Pit-1 por los fibroblastos del GC y la afectación de los ganglios no centinela

| | Afectación Ganglios no centinela | | TOTAL | VALOR de P |
|--|----------------------------------|------------|------------|------------|
| | No | Sí | | |
| Expresión de MMP-1 + por las CMI GC y Pit-1 - por los fibroblastos GC | 16 (40%) | 21 (52,5%) | 37 (92,5%) | 0,856 |
| Expresión de MMP-1 + por las CMI GC y Pit-1 positiva por los fibroblastos GC | 2 (5%) | 1 (2,5%) | 3 (7,5%) | |
| TOTAL | 18 (45%) | 22 (55%) | 40 (100%) | |

6. DISCUSIÓN

La linfadenectomía axilar (LA) en pacientes tratadas de cáncer de mama, con GC positivo, es un tema que, como ya hemos comentado, está en continua discusión. Se sabe, que entre el 40-70% de los casos en que el GC está afecto, el resto de los ganglios de la LA están libres de enfermedad (108), porcentaje que aumenta hasta el 80-85% en el caso de las micrometástasis (109).

Por lo tanto, el siguiente paso en la BSGC en cáncer de mama, sería tratar de determinar qué pacientes con GC positivo, precisarían una LA u otro tipo de tratamiento sobre la axila, como radioterapia.

El objetivo de esta tesis es demostrar la utilidad de un nuevo marcador molecular que nos ayudará a identificar a estos pacientes. Dicho marcador es la MMP-1 expresada por las CMI de los GC metastásicos.

Basándose en estudios previos se ha demostrado que existen muchas evidencias que indican un papel destacado de las células inflamatorias del estroma en la progresión tumoral. Así, por una parte, el crecimiento tumoral y la invasión se asocian con muerte celular significativa, producida por apoptosis o necrosis, y sabemos, que las células necróticas liberan numerosos mediadores de la inflamación que son un potente estimulador de macrófagos.

Por otra parte, las células tumorales pueden inducir una respuesta inflamatoria, secretando citocinas y quimiocinas, reclutando así diversos tipos de células inflamatorias (183).

Estas asociaciones, indicativas de que la infiltración tumoral de macrófagos se asocia con una mayor agresividad tumoral, están de acuerdo con diversos estudios que demuestran la asociación entre la infiltración de macrófagos y una mayor progresión tumoral. Así, existe evidencia que apoya la hipótesis de que la inflamación participa en la provisión de condiciones que conducen al cáncer. Una inflamación sin resolver debido a cualquier fracaso en el control preciso de la respuesta inmune puede continuar para perturbar el microambiente celular, lo que conduce a alteraciones en los genes relacionados con el cáncer y la modificación de las proteínas celulares cruciales involucradas en el ciclo celular, reparación del ADN y la apoptosis.

Además, hay datos que indican que células inflamatorias y mediadores inmunomoduladores presentes en la progresión del tumor influyen en el microambiente tumoral y la metástasis. Históricamente, los leucocitos infiltrantes de tumor han sido considerados como manifestaciones de un mecanismo de defensa intrínseca contra el desarrollo de tumores. Sin embargo, existe un aumento de la evidencia que indica que la infiltración de leucocitos puede promover fenotipos tumorales que favorecen la angiogénesis, el crecimiento y la invasión. Esto puede ser debido a que las células inflamatorias probablemente pueden influir la promoción del cáncer mediante la secreción de citoquinas, factores de crecimiento, quimiocinas y proteasas, que estimulan la proliferación y el potencial invasivo de las células cancerosas (184).

Una de esas proteasas es la MMP-1, que es la más ubicua de las colagenasas intersticiales. La MMP-1 es capaz de romper varios componentes de la matriz extracelular, incluyendo el colágeno tipo I (que es el principal componente del tejido conectivo), II, III, VII, VIII y IX, los agreganos, inhibidores de serín proteasas y la $\alpha 2$ macroglobulina (185). Esta capacidad de degradación de MMP-1 puede ser la responsable de promover la extensión del tumor a través de los ganglios linfáticos, ya que el resultado de nuestro trabajo muestra que la expresión global de MMP-1 en los GC metastásicos se correlaciona positiva y significativamente con el estado de los ganglios no centinela.

En nuestro estudio se ha observado que ninguno de los casos de GC negativo para la expresión de MMP-1 por las CMIs ($n=0$), se asoció con ganglios no centinela metastásicos, mientras, que todos los casos de ganglios no centinela positivos (53 de 53, 100%) mostraron expresión de MMP-1 por las CMIs. Por lo tanto, nuestro hallazgo de que la MMP-1 se asoció de forma muy significativa con el estado de los ganglios no centinela, es especialmente relevante.

Nuestros resultados reproducen los obtenidos en el trabajo previo publicado por Eiró "et al" (142) lo que demuestra que MMP-1 puede considerarse un útil marcador de predicción de la afectación de ganglios no centinela tras la identificación de un ganglio centinela metastásico.

Estos resultados pueden parecer contradictorios con los publicados previamente, con respecto a la falta de asociación entre la alta expresión de MMP-1 por las MICs de los tumores primarios y la presencia de metástasis a distancia en los CM (140). Sin embargo, los datos obtenidos en este trabajo indican que la expresión de MMP-1 por las CMIIs del GC están implicadas en la progresión del tumor a través del sistema linfático axilar, vía de diseminación completamente diferente a la hematológica, que es la responsable de las metástasis a distancia.

Nuestros datos nos inducen a considerar que las características propias del tumor primario, y en especial de sus células estromales, tienen mayor influencia sobre el desarrollo de metástasis hematológicas, que las peculiaridades biológicas de las células cancerosas que metastatizan los ganglios linfáticos regionales, al menos en cuanto a sus respectivas expresiones de MMPs y TIMPs. Así pues, ello parece apoyar el concepto de que las metástasis ganglionares y las hematológicas entrañan mecanismos diferentes de diseminación tumoral. Así mismo, nuestros resultados apoyan el concepto de que los ganglios linfáticos metastásicos, si bien contribuyen a un estadiaje de interés pronóstico en el cáncer de mama, no tienen un papel controlador del desarrollo posterior de metástasis a distancia en órganos vitales, los cuales tienen una implicación decisiva sobre la supervivencia (186).

Una hipótesis razonable de esto es que las células tumorales, aún teniendo la propiedad para crecer en los ganglios linfáticos e invadir secuencialmente otros ganglios linfáticos, pueden no tener la capacidad de penetrar en los vasos sanguíneos y crecer en otros órganos. De acuerdo con esto, se ha demostrado que las células metastásicas de los ganglios linfáticos de CM cuando son inyectadas en modelos animales, metastatizan sistemáticamente en el estroma de los ganglios linfáticos (187). Además, esta observación está de acuerdo con recientes estudios, indicando que las metástasis provocadas por líneas celulares de cáncer mamario metastásico inyectadas en modelos animales, muestran una propensión selectiva a crecer en esos mismos órganos, con un perfil genético similar (188).

Nuestros resultados son potencialmente importantes porque, a nuestro entender, es la primera vez que la extensión tumoral a los ganglios axilares no centinela, se ha

predicho a partir de las características moleculares de las CMIS de los ganglios centinela.

Clásicamente, los factores biológicos que predicen la afectación axilar en cáncer de mama, se estudiaron en el tumor primario (189, 190). Sin embargo, el estudio del drenaje de los ganglios linfáticos, y especialmente el de los GC, ha despertado un gran interés, ya que estos ganglios están expuestos a todos los factores solubles procedentes del tumor, y también pueden ser colonizados por clones agresivos que derivan de este tumor primario. En relación con esto, resultan interesantes estudios previos del grupo del Dr. Vizoso que encontraron que cuando comparaban la expresión de MMPs y TIMPs entre diferentes localizaciones del tumor (centro del tumor, margen invasivo y los ganglios linfáticos axilares metastásicos), la mayor concordancia se encontraba entre los ganglios linfáticos metastásicos (171). Estos hallazgos sugieren que clones celulares del tumor primario que colonizan los ganglios regionales muestran una tendencia a producir un fenotipo similar de MMPs y TIMPs.

También se ha visto que existe una relación entre el incremento de células dendríticas en la frontera tumoral y una mayor posibilidad de la aparición de metástasis en el ganglio centinela, algo que podría ser debido a la capacidad fagocítica de las células dendríticas que, interiorizando macromoléculas de células tumorales con efecto inmunosupresor, migrarían posteriormente desde la frontera tumoral al GC, ejerciendo un efecto facilitador de la colonización posterior de las células tumorales en el ganglio. En este sentido, es sabido que los tumores pueden producir sustancias inmunosupresivas de efecto inmunomodulador en los GC (191). De hecho, se ha descrito en el cáncer de mama que en los ganglios axilares metastásicos hay una menor presencia de células T citotóxicas en relación con los ganglios no metastásicos (192).

Asimismo, resultan interesantes los recientes datos de que el bloqueo del drenaje hacia los ganglios linfáticos de moléculas y linfocitos, tales como células dendríticas, mediante la utilización de nanopartículas, remodela la respuesta inmune antitumoral (193). Se ha descrito, que la administración local de factor estimulante de colonias

granulocito/macrófago incrementa el número y efecto de activación antitumoral de las células dendríticas en el GC de los melanomas (194), lo que sugiere la posibilidad de la modificación del estado de activación de las células dendríticas como posible herramienta terapéutica en el cáncer de mama.

Nuestros resultados apoyan un estudio previo en el que se demuestra que la expresión de MMP-1 por las CMI del estroma peritumoral en el ganglio linfático axilar metastásico se asocia con el número de ganglios linfáticos afectados (171). Esto parece indicar que las células tumorales metastásicas tienen la habilidad de inducir la producción de estas proteínas en células huésped, dentro de los ganglios linfáticos, lo que hace hincapié en la importancia de las interacciones a nivel del estroma para favorecer la progresión tumoral entre los ganglios linfáticos axilares.

A día de hoy existen varios nomogramas, como los descritos en apartados anteriores (113, 114, 115), que tratan de predecir, basándonos en parámetros tumorales clásicos, el estado del resto de los ganglios axilares en aquellas pacientes en las que encontramos un GC positivo.

Sin embargo, muchos expertos consideran que la utilización de nomogramas como elemento único en la toma de decisiones clínicas tiene limitaciones. Por lo tanto estos métodos pueden considerarse como un elemento más, pero no el único para identificar a los pacientes con GC positivo en los que se puede evitar una LA (117, 195, 196).

En nuestro trabajo hemos relacionado estos parámetros clínico-patológicos clásicos que se describen en los nomogramas, con la expresión de MMP-1 por las CMI del GC y con la afectación o no de los ganglios no centinela en los casos con expresión positiva de MMP-1 por el GC, de cara a mejorar la capacidad de predicción de la afectación de los ganglios no centinela en estas pacientes.

Varios estudios publicados indican que el tamaño tumoral primario (197) y el diámetro de las metástasis son factores estadísticamente significativos para predecir el estado de los ganglios no centinela.

Cuando nosotros analizamos la relación entre la expresión de la MMP-1 por las CMI del GC metastásico y el tamaño tumoral, inicialmente no encontramos una relación estadísticamente significativa entre ambos parámetros. Sin embargo, cuando analizamos la relación entre el tamaño tumoral y la afectación de los ganglios no centinela en las pacientes con expresión de MMP-1 en los GC patológicos sí encontramos una asociación estadísticamente significativa.

Por el contrario, en lo que respecta al tipo de metástasis, parámetro que en muchas publicaciones se considera un factor muy importante para predecir el estado de los ganglios no centinela (110, 198), en nuestro trabajo inicialmente sí encontramos una asociación estadísticamente significativa cuando lo relacionamos con la expresión de MMP-1 por las CMI del GC ($p < 0,001$). Sin embargo, al analizar la relación entre el tamaño de las metástasis y la afectación de los ganglios no centinela en las pacientes con expresión positiva de MMP-1 en los GC, la relación no fue estadísticamente significativa.

También encontramos resultados contradictorios cuando analizamos la invasión linfovascular, parámetro que al igual que los anteriores, se ha demostrado en otros trabajos como un factor predictor del estado de los ganglios no centinela (199). En nuestro caso al analizar la relación entre la invasión linfovascular y la expresión de MMP-1, no encontramos una asociación estadísticamente significativa. Sin embargo, al relacionar dicha invasión con la afectación o no de los ganglios no centinela, en las pacientes con expresión positiva de MMP-1, sí objetivamos una asociación estadísticamente significativa, por lo que sí podríamos tenerlo en cuenta como un parámetro útil para predecir el estado de los ganglios no centinela.

Otro parámetro que en nuestro trabajo ha arrojado resultados favorables de cara a predecir el estado de los ganglios no centinela es el grado de diferenciación tumoral. Tanto en lo que respecta a la relación con la expresión de MMP-1 por las CMI del GC, como a la relación con la afectación de los ganglios no centinela en las pacientes con expresión positiva de MMP-1, encontramos una asociación estadísticamente significativa.

Analizando la sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de los parámetros en los que sí encontramos relación estadísticamente significativa con respecto a la afectación de los ganglios no centinela (Tamaño tumoral, grado histológico e invasión linfática) vemos que en algunos de ellos, como el tamaño tumoral, sí mejora la especificidad de la prueba, respecto a la analizada para la expresión de MMP-1 por las CMI del GC, pero en detrimento de la sensibilidad y VPN.

En lo que respecta al grado histológico y la invasión linfática los valores de especificidad y VPP son similares a los obtenidos al analizar la expresión de MMP-1 en el GC, sin embargo la sensibilidad y el VPN obtienen resultados muy inferiores.

Por lo tanto, basándonos en estos resultados, no podemos recomendar de forma categórica el uso en la práctica clínica, de dichos parámetros de cara a mejorar la predicción de afectación de los ganglios no centinela en pacientes con expresión positiva de MMP-1 por las CMI del ganglio centinela metastásico.

En el presente estudio también evaluamos la posible relación entre la expresión de MMP-1 y la de Pit-1. Ya que un estudio reciente demuestra que este factor de transcripción induce la producción de MMP-1 en líneas celulares de cáncer de mama (181, 182). Pit-1 juega un papel fundamental en la diferenciación de las células durante la organogénesis de la glándula hipofisaria anterior en los mamíferos y es un activador de la transcripción de genes de la hipófisis. Sin embargo, la expresión de Pit-1 también se ha demostrado en algunos tejidos como en la mama humana, donde puede jugar un papel fundamental en la diferenciación de las células de ese tejido.

Pero también, se ha objetivado un aumento en la expresión de Pit-1 en el cáncer de mama, con respecto a la mama normal. Además se ha descrito que la sobreexpresión o el bloqueo de Pit-1 en líneas celulares de cáncer de mama humano inducen profundos cambios fenotípicos en la expresión de proteínas implicadas en proliferación celular, apoptosis y metástasis.

Además, los altos niveles de Pit-1 en el tejido tumoral se correlacionan con un mayor índice de metástasis en pacientes con cáncer de mama (181).

También existen datos que demuestran que Pit-1 regula en la célula tumoral la expresión de proteínas implicadas en el desarrollo de metástasis (182).

En el presente estudio evaluamos la expresión de Pit-1 en los ganglios centinela metastásicos en 62 casos, encontrando una amplia variabilidad de los valores de expresión de Pit-1 (Score) tanto en los casos con expresión de MMP-1 por las CMI de los ganglios centinela metastásicos, como en las que no se expresaban MMP1.

En nuestro trabajo no hayamos una relación estadísticamente significativa entre la expresión global de Pit-1 por los GC metastásicos y la afectación de los ganglios no centinela, así como tampoco encontramos dicha relación cuando analizamos la expresión de Pit-1 en cada tipo celular del GC y la afectación de los ganglios no centinela.

Tampoco se determinó una asociación significativa entre la expresión del factor de transcripción Pit-1 (valor en relación a la mediana) en los ganglios centinela metastásicos y la expresión de la MMP-1 por las CMI de dicho GC, así como tampoco encontramos una relación significativa entre la expresión de Pit-1 por los diferentes tipos celulares del GC metastásico (células tumorales, fibroblastos y CMI) y la expresión de MMP-1.

Para tratar de mejorar la predicción de la afectación de los ganglios no centinela, relacionamos la expresión de Pit-1 en los GC metastásicos con las características clínico-patológicas de los pacientes y sus tumores. Pero no encontramos una asociación estadísticamente significativa entre ninguno de esos parámetros y la expresión de Pit-1 ni en relación al Score, ni cuando analizamos su expresión en los diferentes tipos celulares del GC metastásico.

Por tanto, estos resultados inducen a considerar que deben existir otros factores implicados en la regulación de la MMP-1 en las CMIs del ganglio centinela.

Este estudio concluye, que la expresión de MMP-1 por las CMIs del ganglio centinela muestra una sensibilidad del 100%, con un valor predictivo negativo del 100% y una especificidad del 54,72%, para predecir el estado de los ganglios no centinela. Por lo tanto, si estos resultados se confirman en otras series, la determinación de MMP-1

podría ayudar a evitar la realización de la LA u otro tipo de tratamientos innecesarios sobre la axila en un porcentaje significativo de pacientes (40-70%), en las que se detectan metástasis en el ganglio centinela, evitando la morbilidad que dichos tratamientos conlleva.

7. CONCLUSIONES

1. La expresión de MMP-1 por las células mononucleares inflamatorias del ganglio centinela metastásico en el cáncer de mama como factor predictor de la afectación de los ganglios no centinela, muestra una sensibilidad del 100%, un valor predictivo negativo del 100% y una especificidad del 54,72%. Por lo que podemos concluir que hemos reproducido los resultados obtenidos en el trabajo previo publicado por Eiró N "et al", lo que nos permite afirmar que en aquellas pacientes en las que no se expresa MMP-1 por las CMI del GC metastásico, se podría evitar la linfadenectomía axilar, o cualquier otro tipo de tratamiento sobre la axila.
2. No se ha encontrado una relación significativa entre la expresión de MMP-1 y Pit-1 en los ganglios centinela positivos, ni tampoco entre la expresión de Pit-1 y la afectación de los ganglios no centinela.
3. La combinación de MMP-1 con el tamaño tumoral mejora la especificidad de la prueba, de cara a predecir la afectación de los ganglios no centinela, pero en detrimento de la sensibilidad.
4. La combinación de MMP-1 con el tamaño tumoral, la invasión linfática y el grado histológico de tumor, mejoran ligeramente el Valor predictivo positivo de la prueba, de cara a predecir la afectación de los ganglios no centinela, pero en detrimento del Valor predictivo negativo.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Martín Angulo M, Arroyo Yustos M, Villalobos León ML, Álvarez de Mon Soto M. Cáncer de mama. *Medicine*. 2013; 11(27): 1629-40.
2. Perou CM, Parker JS, Prat A, Ellis MJ, Bernard PS. Clinical implementation of the intrinsic subtypes of breast cancer. *Lancet Oncol*. 2010; 11(8): 718-9
3. Dávila-Arias C, Ocón O, Fernández MF, Arrebola JP, Sánchez MJ et al. Factores relacionados con la supervivencia libre de enfermedad en el cáncer de mama. *Med Clin (Barc)*. 2014; 143 (7): 293-9
4. Rampaul RS, Rakha EA, Robertson JFR, Ellis IO. Pathology and biology of breast cancer. In: Dixon JM, editors. *Breast surgery*. Edinburgh: Elsevier Limited; 2014. p. 20-43
5. Domènech A, Benítez A, Bajén MT, Ricart Y, Rodríguez-Gasén A et al. What are the preoperative factors that can determine the presence of metastases in other axillary nodes in breast cancer when the sentinel node is positive? *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2009; 53 (4): 422-7
6. GradisharWJ, Anderson BO, Balassanian R, Blair SL, Burstein HJ et al. Breast cancer. *J Natl Compr Canc Netw*. 2015; 13 (4): 448-75
7. López-Abente G, Mispireta S, Pollán M. Breast and prostate cancer: an analysis of common epidemiological features in mortality trends in Spain. *BMC Cancer* 2014, 14:879
8. López Abente G, Aragonés N, Pérez-Gómez B, Pollán M, García-Pérez J et al. Time trends in municipal distribution patterns of cancer mortality in Spain. *BMC Cancer*. 2014; 14:535

9. Pollán M, Pastor-Barriuso R, Ardanaz E, Argüelles M, Martos C et al. Recent changes in breast cancer incidence in Spain, 1980-2004. *J Natl Cancer Inst.* 2009; 101 (22): 1584-91
10. Osorio A, Barroso A, Martínez B, Cebrián A, San Román JM et al. Molecular analysis of the BRCA 1 and BRCA 2 genes in 32 breast and/or ovarian cancer Spanish families. *Br J Cancer.* 2000; 82 (7): 1266-70
11. Hartmann LC, Sellers TA, Frost MH, Lingle WL, Degen AC et al. Benign breast disease and the risk of breast cancer. *N Engl J Med.* 2005; 353(3): 229-37
12. Duarte E, de Sousa B, Cadarso-Suárez C, Rodríguez V, Kneib T. Structured additive regression modeling of age of menarche and menopause in a breast cancer screening program. *Biom J.* 2014; 56 (3): 416-27
13. McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases: breast cancer epidemiology, risk factors and genetics. *Brit Med J.* 2000; 321(7261): 624-8
14. Zhou Y et al. Association between breastfeeding and breast cancer risk: evidence from a meta-analysis. *Breastfed Med.* 2015 Apr; 10 (3): 175-82
15. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease. *Lancet.* 2002; 360 (9328): 187-95
16. Alexander IM. The history of hormone therapy use and recent controversy related to heart disease and breast cancer arising from prevention trial outcomes. *J Midwifery Womens Health.* 2012; 57(6): 547-57

17. Harvie M, Howell A, Evans DG. Can diet and lifestyle prevent breast cancer: what is the evidence? *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2015: e66-73. doi: 10.14694/EdBook
18. Espié M, Hamy AS, Eskenazy S, Cuvier C, Giacchetti S. Epidemiología del cáncer de mama. En: Fernández H, Riethmuller D editores. *EMC Ginecología-Obstetricia*. París: Elsevier Masson SAS; 2013. p. 1-19
19. Clark GM, Hilsenbeck SG, Ravdin PM, De Laurentiis M, Osborne CK. Prognostic factors: rationale and methods of analysis and integration. *Breast Cancer Res Treat*. 1994; 32 (1): 105-12
20. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC et al. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med*. 2000; 124(7): 966-78
21. Anders CK, Hsu DS, Broadwater G, Acharya CR, Foekens JA et al. Young age at diagnosis correlates with worse prognosis and defines a subset of breast cancers with shared patterns of gene expression. *J Clin Oncol*. 2008; 26(20): 3324-30
22. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med*. 2002; 347(25): 1999-2009
23. Almagro E, González CS, Espinosa E. Factores pronósticos en el cáncer de mama en estadio inicial. *Med Clin (Barc)*. 2015; pii:S0025-7753(15)00039-1. doi:10.1016/.medcli.2014.12.019
24. Turrion F, Medina C, Huerga D, Vilches M, Miró C et al. Supervivencia del cáncer de mama a los 10 y 15 años en 1147 enfermas tratadas con cirugía y tratamiento complementario. *Cir Esp*. 2000; 67(7): 438-44

25. Romond EH, Jeong JH, Rastogi P, Swain SM, Geyer CE Jr et al. Seven-year follow-up assessment of cardiac function in NSABP B-31, a randomized trial comparing doxorubicin and cyclophosphamide followed by paclitaxel (ACP) with ACP plus trastuzumab as adjuvant therapy for patients with node-positive, human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer. *J Clin Oncol.* 2012; 30(31): 3792-9
26. Alkhatib W, Connor C, Fang F. Solitary positive sentinel lymph node accompanied by negative sentinel lymph node(s) is predictive of a negative completion axillary lymph node dissection. *Am J Surg.* 2007; 194(6): 856-8
27. Rosen PP, Groshen S, Kinne DW. Prognosis in T2N0M0 stage I breast carcinoma: a 20-year follow-up study. *J Clin Oncol.* 1991; 9(9): 1650-61
28. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24740 breast cancer cases. *Cancer.* 1989; 63(1): 181-7
29. Arriagada R, Le MG, Dunant A, Tubiana M, Contesso G. Twenty-five years of follow-up in patients with operable breast carcinoma: correlation between clinicopathologic factors and the risk of death in each 5-year period. *Cancer.* 2006; 106(4): 743-50
30. Dieci MV, Orvieto E, Dominici M, Conte P, Guarneri V. Rare breast cancer subtypes: histological, molecular and clinical peculiarities. *Oncologist.* 2014; 19(8): 805-13
31. Bloom HJ, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer.* 1957; 11(3): 359-77
32. Pinder SE, Murray S, Ellis IO, Triharia H, Elston CW et al. The importance of the histologic grade of invasive breast carcinoma and response to chemotherapy. *Cancer.* 1998; 83(8) 1529-39

33. Schoppmann SF, Bayer G, Aumayr K, Taucher S, Geleff S et al. Prognostic value of lymphangiogenesis and lymphovascular invasion in invasive breast cancer. *Ann Surg.* 2004; 240(2): 306-12
34. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet.* 2005; 365(9472): 1687-717
35. Ibraim E, Al-Gahmi AM, Zeenelin AA, Zekri JM, Elkhodary TR et al. Basal vs. luminal A breast cancer subtypes: a matched case-control study using estrogen receptor, progesterone receptor and HER2 as surrogate markers. *Med Oncol.* 2009; 26(3): 372-8
36. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL 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; 134(6): 907-22
37. Tsutsui S, Ohno S, Murakami S, Kataoka A, Kinoshita J et al. Histological classification of invasive ductal carcinoma and the biological parameters in breast cancer. *Breast Cancer.* 2003; 10(2): 149-52
38. Clark GM, McGuire WL. Follow-up study of HER-2/neu amplification in primary breast cancer. *Cancer Res.* 1991; 51(3): 944-8
39. Palacios J, Andreu X, Calasanz MJ, Concha A, Corominas JM et al. Recomendación para la determinación de HER2 en cáncer de mama. Consenso nacional de la Sociedad Española de Anatomía Patológica (SEAP) y de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). *Rev Esp Patol.* 2009; 42(1): 3-16

-
40. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 2005; 353(16): 1659-72
41. Pathmanathan N, Balleine RL. Ki67 and proliferation in breast cancer. *J Clin Pathol.* 2013; 66(6): 512-6
42. Rakha EA, El-Sayed ME, Lee AH, Elston CW, Grainge MJ et al. Prognostic significance of Nottingham histologic grade in invasive breast carcinoma. *J Clin Oncol.* 2008; 26(19): 3153-8
43. Olivotto IA, Bajdik CD, Ravdin PM, Speers CH, Coldman AJ et al. Population-based validation of the prognostic model ADJUVANT! for early breast cancer. *J Clin Oncol.* 2005; 23(12): 2716-25
44. Györfy B, Hatzis C, Sanft T, Hofstatter E, Aktas B et al. Multigene prognostic tests in breast cancer: past, present, future. *Breast Cancer Res.* 2015; 17: 11
45. Cuadros M, Llanos A. Validez clínica y analítica de Mammaprint® en tratamiento del cáncer de mama. *Med Clin (Barc).* 2011; 136(14): 627-32
46. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med.* 2004; 351(27): 2817-26
47. Sparano JA, Gray RJ, Makower DF, Pritchard KI, Albain KS et al. Prospective validation of a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2015; 373(21): 2005-14

48. Martín M, Brase JC, Calvo L, Krappmann K, Ruiz-Borrego M et al. Clinical validation of the EndoPredict test in node-positive, chemotherapy-treated ER+/HER2- breast cancer patients: results from the GEICAM 9906 trial. *Breast Cancer Res.* 2014; 16(2): R38.
49. Nielsen T, Wallden B, Schaper C, Ferree S, Liu S et al. Analytical validation of the PAM50-based Prosigna Breast Cancer Prognostic Gene Signature Assay and nCounter Analysis System using formalin-fixed paraffin-embedded breast tumor specimens. *BMC Cancer.* 2014; 14: 177
50. WHO Classification of Tumors of the Breast. In Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, Van de Vijver MJ, eds.: *WHO Classification of Tumors of the Breast.* 4th ed. Lyon: International agency for research on cancer; 2012. p 8-9
51. AJCC: Breast. In Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al., eds.: *AJCC Cancer Staging Manual.* 7th ed. New York, NY: Springer, 2010. p 347-76
52. Lluch A, Eroles P, Martínez de Dueñas E. Clasificación molecular del cáncer de mama. En Díaz-Faes J, Ruibal A, Tejerina A, editores. *Cáncer de mama. Aspectos de interés actual.* Madrid: ADEMÁS comunicación gráfica S.L; 2012. p. 103-22
53. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, Van de Rijn M, Jeffrey SS et al. Molecular portraits of human breast tumors. *Nature.* 2000; 406 (6797): 747-52
54. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98(19): 10869-74

-
55. Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, Mikaelian I, Usary J et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol* 2007; 8(5): R76
56. Sabatier R, Finetti P, Guille A, Adelaide J, Chaffanet M et al. Claudin-low breast cancers: clinical, pathological, molecular and prognostic characterization. *Mol Cancer*. 2014; 13: 228
57. Fan C, Oh DS, Wessels L, Weigelt B, Nuyten DS et al. Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. *N Engl J Med*. 2006; 355(6): 560-9
58. Loi S, Haibe-Kains B, Desmedt C, Lallemand F, Tutt AM et al. Definition of clinically distinct molecular subtypes in estrogen receptor-positive breast carcinomas through genomic grade. *J Clin Oncol*. 2007; 25(10): 1239-46
59. Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S et al. Ki67 index, HER2 status and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2009; 101(10): 736-50
60. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, Ibrahim N, Cristofanilli M et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2005; 11(16): 5678-85
61. Yao K, Goldschmidt R, Turk M, Wesseling J, Stork-Sloots L et al. Molecular subtyping improves diagnosis stratification of patients with primary breast cancer into prognostically defined risk groups. *Breast Cancer Res Treat*. 2015; 154(1): 81-8
62. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*. 2001; 344(11): 783-92

63. Pu X, Shi J, Li Z, Feng A, Ye Q. Comparison of the 2007 and 2013 ASCO/CAP evaluation systems for HER2 amplification in breast cancer. *Pathol Res Pract*. 2015; 211(6): 421-5
64. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004; 10(16): 5367-74
65. Blows FM, Driver KE, Schmidt MK, Broeks A, van Leeuwen FE et al. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: A collaborative analysis of data for 10159 cases from 12 studies. *PLoS Med* 2010; 7(5):e1000279.doi:10.1371/journal.pmed.1000279
66. Joosse SA, Brandwijk KI, Mulder L, Wesseling J, Hannemann J et al. Genomic signature of BRCA1 deficiency in sporadic basal-like breast tumors. *Genes Chromosomes Cancer*. 2011; 50(2): 71-81
67. Leidy J, Khan A, Kandil D. Basal-like breast cancer: update on clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular features. *Arch Pathol Lab Med*. 2014; 138(1): 37-43
68. Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2010; 12(5): R68. Doi:10.1186/bcr2635. Epub 2010 Sep 2
69. Gerhard R, Ricardo S, Albergaria A, Gomes M, Silva AR et al. Immunohistochemical features of claudin-low intrinsic subtype in metaplastic breast carcinomas. *Breast*. 2012; 21(3): 354-60

70. Prat A, Pineda E, Adamo B, Galván P, Fernández A et al. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *Breast*. 2015; pii:S0960-9776(15)00146-0.doi:10.1016/j.breast.2015.0.008
71. Halsted WS. 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; 20(5): 497-555
72. del Val Gil JM, López Bañeres MF, Rebollo RJ, Utrillas AC, Minguillón A. Cáncer de mama y mastectomía. Estado actual. *Cir Esp*. 2001; 69: 56-64
73. Veronesi U, Saccozzi R, Del Vecchio M, Banfi A, Clemente C et al. Comparing radical mastectomy with quadrantectomy, axillary dissection, and radiotherapy in patients with small cancers of the breast. *N Engl J Med*. 1981; 305(1): 6-11
74. Shimo A, Tsugawa K, Tsuchiya S, Yoshie R, Tsuchiya K et al. Oncologic outcomes and technical considerations of nipple-sparing mastectomies in breast cancer: experience of 42 cases from a single institution. *Breast cancer*. 2015; Oct 13 (Epub ahead of print)
75. Schwartz GF, Giuliano AE, Veronesi U; Consensus Conference Committee. 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; 94(10): 2542-51
76. Sabadell MD, Piñero A, Gimenez MJ. Tratamiento quirúrgico. Cirugía primaria. Cirugía en neoadyuvancia. Ganglio centinela. En Modolell A, Sabadell MD, Izquierdo M, Prats M, editores. *Manual de práctica clínica en senología*. Madrid: Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria. 2012. p. 48-51

77. Gould EA, Winship T, Philbin PH, Kerr HH. Observations on a "sentinel node" in cancer of the parotid. *Cancer*. 1960; 13: 77-8
78. Cabanas RM. An approach for the treatment of penile carcinoma. *Cancer*. 1977; 39(2): 456-66
79. Morton DL, Wen DR, Wong JH, Economou JS, Cagle LA et al. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg*. 1992; 127(4): 392-9
80. Giuliano AE, Kirgan DM, Guenther JM, Morton DL. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. *Ann Surg*. 1994; 220 (3): 391-8
81. Krag DN, Weaver DL, Alex JC, Fairbank JT. Surgical resection and radiolocalization of the sentinel lymph node in breast cancer using a gamma probe. *Surg Oncol*. 1993; 2(6): 335-9
82. Albertini JJ, Lyman GH, Cox C, Yeatman T, Balducci L et al. Lymphatic mapping and sentinel node biopsy in the patient with breast cancer. *JAMA*. 1996; 276 (22): 1818-22
83. Krag DN, Anderson SJ, Julian TB, Brown AM, Harlow SP 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; 8(10): 881-8
84. Bernet L, Piñero A, Vidal-Sicart S, Peg V, Giménez J et al. Consenso sobre la biopsia selectiva del ganglio centinela en el cáncer de mama. Revisión 2013 de la Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria. *Rev Senología Patol Mam*. 2014; 27(1): 43-53

85. Giammarile F, Alazraki N, Aarsvold JN, Audisio RA, Glass E et al. The EANM and SNMMI practice guideline for lymphoscintigraphy and sentinel node localization in breast cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2013; 40(12): 1932-47
86. Kuehn T, Bauerfeind I, Fehm T, Fleige B, Hausschild M et al. Sentinel-lymph-node biopsy in patients with breast cancer before and after neoadjuvant chemotherapy (SENTINA): a prospective, multicentre cohort study. *Lancet Oncol*. 2013; 14(7): 609-18
87. Boughey JC, Suman VJ, Mittendorf EA, Ahrendt GM, Wilke LG et al. Sentinel lymph node surgery after neoadjuvant chemotherapy in patients with node-positive breast cancer: the ACOSOG Z1071 (Alliance) clinical trial. *JAMA*. 2013; 310(14): 1455-61
88. Caudle AS, Yang WT, Mittendorf EA, Black DM, Hwang R et al. Selective surgical localization of axillary lymph nodes containing metastases in patients with breast cancer: a prospective feasibility trial. *JAMA*. 2015; 150(2): 137-43
89. Bernet L, Piñero A, Vidal-Sicart S, Cano R, Cordero JM et al. Actualización del consenso sobre la biopsia selectiva del ganglio centinela en el cáncer de mama. *Rev Senología Patol Mam*. 2010; 23(5): 201-8
90. Montgomery LL, Thorne AC, Van Zee KJ, Fey J, Heerdt AS et al. Isosulfan blue dye reactions during sentinel lymph node mapping for breast cancer. 2002; 95(2): 385-8
91. Giménez Climent MJ, Vidal-Sicart S, Bernet Vegué L. Diagnóstico y tratamiento quirúrgico de los ganglios loco-regionales. En Modolell A, Sabadell MD, Izquierdo M, Prats M, editores. *Manual de Práctica Clínica en Senología 2015*. Madrid: Fundación Española de Senología y Patología Mamaria. 2015. P. 220-8

92. Noguchi M, Inokuchi M, Zen Y. Complement of peritumoral and subareolar injection in breast cancer sentinel lymph node biopsy. *J Surg Oncol.* 2009; 100(2): 100-5
93. Vidal-Sicart S, Rioja Martín ME. Detección gammagráfica e intraoperatoria del ganglio centinela en el cáncer de mama. *Rev Esp Med Nucl.* 2009; 28(1): 41-3
94. Blanco Saiz I, Vidal-Sicart S. Ganglio centinela en Cáncer de Mama. En Blanco I, Moriyón C, Peláez I, editores. *Guía Práctica de Patología Mamaria "Bruno Salvadori"*. Asturias. 2009. P. 135-50
95. Serrano J, Infante de la Torre JR, Domínguez ML, García Bernardo L, Durán C et al. Optimización de la biopsia selectiva de ganglio centinela en el cáncer de mama mediante palpación axilar intraoperatoria. *Rev Esp Med Nucl.* 2010; 29(1): 8-11
96. Postma EL, van Wieringen S, Hobbelenk MG, Verkooijen HM, van den Bongard HJ et al. Sentinel lymph node biopsy of the internal mammary chain in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 134(2): 735-41
97. Layfield DM, Agrawal A, Roche H, Cutress RI. Intraoperative assessment of sentinel lymph nodes in breast cancer. *Br J Surg.* 2011; 98(1): 4-17
98. Viale G, Mastropasqua MG, Maiorano E, Mazzarol G. Pathologic examination of the axillary sentinel lymph nodes in patients with early-stage breast carcinoma: current and resolving controversies on the basis of the European Institute of Oncology experience. *Virchows Arch.* 2006; 448(3): 241-7
99. Cipolla C, Cabibi D, Fricano S, Vieni S, Gentile I et al. The value of intraoperative frozen section examination of sentinel lymph nodes in surgical management of breast carcinoma. *Langenbecks Arch Surg.* 2010; 395(6): 685-91

-
100. Chagpar A, Middleton LP, Sahin AA, Meric-Bernstam F, Kuerer HM. Clinical outcome of patients with lymph node-negative breast carcinoma who have sentinel lymph node micrometastases detected by immunohistochemistry. *Cancer*. 2005; 103(8): 1581-6
101. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. 2000; 28(12): E63
102. Tsujimoto M, Nakabayashi K, Yoshidome K, Kaneko T, Iwase T et al. One-step nucleic acid amplification for intraoperative detection of lymph node metastasis in breast cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2007; 13(16): 4807-16
103. Rubio IT, Espinosa-Bravo M, Rodrigo M, Amparo Viguri Diaz M, Hardisson D et al. Nomogram including the total tumoral load in the sentinel nodes assessed by one-step nucleic acid amplification as a new factor for predicting nonsentinel lymph node metastasis in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2014; 147 (2): 371-80
104. Peg V, Espinosa-Bravo M, Vieites B, Vilardell F, Antúnez JR 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; 139(1): 87-93
105. Krag DN, Anderson SJ, Julian TB, Brown AM, Harlow SP 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; 11(10): 927-33

106. Veronesi U, Paganelli G, Viale G, Luini A, Zurrada S et al. A randomized comparison of sentinel-node biopsy with routine axillary dissection in breast cancer. *N Engl J Med.* 2003; 349(6): 546-53
107. Langer I, Marti WR, Guller U, Moch H, Harder F et al. Axillary recurrence rate in breast cancer patients with negative sentinel lymph node (SLN) or SLN micrometastases: prospective analysis of 150 patients after SLN biopsy. *Ann Surg.* 2005; 241(1): 152-8
108. Changsri C, Prakash S, Sandweiss L, Bose S. Prediction of additional axillary metastasis of breast cancer following sentinel lymph node surgery. *Breast J.* 2004; 10(5): 392-7
109. Cserni G, Amendoeira I, Apostolikas N, Bellocq JP, Bianchi S 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; 39(12): 1654-67
110. Degnim AC, Griffith KA, Sabel MS, Hayes DF, Cimmino VM et al. Clinicopathologic features of metastasis in nonsentinel lymph nodes of breast carcinoma patients. *Cancer.* 2003; 98(11): 2307-15
111. Van Zee KJ, Manasseh DM, Bevilacqua JL, Boolbol SK, Fey JV 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; 10(10): 1140-51
112. Suyoi A, Bains SK, Kothari A, Douek M, Agbaje O et al. When is a completion axillary lymph node dissection necessary in the presence of a positive sentinel lymph node?. *Eur J. Cancer.* 2014; 50(4): 690-7

113. Kohrt HE, Olshen RA, Bermas HR, Goodson WH, Wood DJ et al. New models and online calculator for predicting non-sentinel lymph node status in sentinel lymph node positive breast cancer patients. *BMC Cancer*. 2008; 8:66
114. Pal A, Provenzano E, Duffy SW, Pinder SE, Purushotham AD. A model for predicting non-sentinel lymph node metastatic disease when the sentinel lymph node is positive. *Br J Surg*. 2008; 95(3): 302-9
115. Barranger E, Coutant C, Flahault A, Delpech Y, Darai E et al. An axilla scoring system to predict non-sentinel lymph node status in breast cancer patients with sentinel lymph node involvement. *Breast Cancer Res Treat*. 2005; 91(2): 113-9
116. Gülben K, Berberoğlu U, Aydoğan O, Kınaş V. Subtype is a predictive factor of nonsentinel lymph node involvement in sentinel node-positive breast cancer patients. *J Breast Cancer*. 2014; 17(4): 370-5
117. Acea B, Calvo Martínez L, Antolín Novoa S, Albaina Latorre L, Juaneda Magdalena M et al. Propuesta de una nueva estrategia terapéutica multidisciplinar en la mujer con cáncer de mama y afectación del ganglio centinela. *Cir Esp*. 2012; 90(10): 626-33
118. Grabau D, Dihge L, Fernö M, Ingvar C, Rydén L. Completion axillary dissection can safely be omitted in screen detected breast cancer patients with micrometastases. A decade's experience from a single institution. *Eur J Surg Oncol*. 2013; 39 (6): 601-7
119. van Rijk MC, Peterse JL, Nieweg OE, Oldenburg HS, Rutgers EJ et al. Additional axillary metastases and stage migration in breast cancer patients with micrometastases or submicrometastases in sentinel lymph nodes. *Cancer*. 2006; 107(3): 467-71

120. de Boer M, van Deurzen CH, van Djick JA; Borm GF, van Diest PJ et al. Micrometastases or isolated tumor cells and the outcome of breast cancer. *N Engl J Med.* 2009; 361(7): 653-63
121. Pepels MJ, de Boer M, Bult P, van Djick JA, van Deurzen CH et al. Regional recurrence in breast cancer patients with sentinel node micrometastases and isolated tumor cells. *Ann Surg.* 2012; 255(1): 116-21
122. Galimberti V, Cole BF, Zurrada S, Viale G, Luini A 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; 14(4): 297-305
123. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B et al. Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol.* 2011; 22(8): 1736-47
124. Giuliano AE, Gangi A. Sentinel node biopsy and improved patient care. *Breast J.* 2015; 21(1): 27-31
125. Giuliano AE, Hunt KK, Ballman KV, Beitsch PD, Whitworth PW et al. Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis: a randomized clinical trial. *JAMA.* 2011; 305(6): 569-75
126. Lautor-Pérez J, Rodríguez-Lescure A. Lectura crítica de la literatura biomédica (I): cómo valorar el riesgo de sesgo de un estudio. *Rev Senol Patol Mamar.* 2015; 28(1): 34-8
127. Caudle AS, Hunt KK, Kuerer HM, Meric-Bernstam F, Lucci A 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; 18(9): 2407-12

128. Ram R, Singh J, McCaig E. Sentinel Node Biopsy Alone versus completion Axillary Node Dissection in Node Positive Breast Cancer: Systematic Review and Meta Analysis. *Int J Breast Cancer.* 2014; 2014:513780. Doi: 10.155/2014/513780. Epub 2014 Oct 14

129. Acea B, García Novoa A, Cereijo C, Rey R, Santiago P et al. Repercusión de los criterios ACOSOG Z0011 sobre la indicación de la linfadenectomía axilar y el control locorregional en mujeres con ganglio centinela metastásico. Resultados preliminares tras cuatro años de aplicación clínica. *Rev Senol Patol Mamar.* 2015; 28: 105-12

130. Goyal A, Dodwell D, Reed MW, Coleman RE. Axillary treatment in women with one or two sentinel nodes with macrometastases: more evidence is needed to inform practice. *J Clin Oncol.* 2014; 32 (34): 3902

131. Senkus E, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P et al. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow up. *Ann Oncol.* 2015; 26 Suppl 5: v8-30

132. Lyman GH, Temin S, Edge SB, Newman LA, Turner RR 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; 32(13): 1365-83

133. Gradishar WJ, Anderson BO, Balassanian R, Blair SL, Burstein HJ et al. Breast Cancer Version 3.2015. *J Natl Compr Canc Netw.* 2015

134. Donker M, van Tienhoven G, Straver ME, Meijnen P, van de Velde CJ et al. Radiotherapy or surgery of the axilla after a positive sentinel node in breast cancer

(EORTC 10981-22023 AMAROS): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 non-inferiority trial. *Lancet Oncol.* 2014; 15 (12): 1303-10

135. Bayo E, Herruzo I, Arenas M, Algara M. Consensus on the regional lymph nodes irradiation in breast cancer. *Clin Transl Oncol.* 2013; 15 (10): 766-73

136. Ozcinar B, Guler SA, Kocaman N, Ozkan M, Gulluoglu BM et al. Breast cancer related lymphedema in patients with different loco-regional treatments. *Breast.* 2012; 21(3): 361-5

137. Goyal A, Dodwell D. POSNOC: A Randomised Trial Looking at Axillary Treatment in women with One or Two Sentinel Nodes with Macrometastases. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* 2015. pii: S0936-6555(15)00312-X

138. OPTimizing Irradiation Through Molecular Assessment of Lymph Node (OPTIMAL). Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02335957>; 2015

139. Piñero A, Algara M, Bernet L, Camps J, Moreno A et al. Encuesta nacional sobre la actitud ante el hallazgo de metástasis en el ganglio centinela por cáncer de mama en distintas unidades hospitalarias. *Rev Senol Patol Mamar.* 2012; 25 (3): 89-95

140. Vizoso FJ, González LO, Corte MD, Rodríguez JC, Vázquez J et al. Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in breast cancer. *Br J Cancer.* 2007; 96(6): 903-11

141. Eiró N, González L, González LO, Fernández-García B, Lamelas ML et al. Relationship between the inflammatory molecular profile of breast carcinomas and distant metastasis development. *PLoS One.* 2012; 7(11): e49047

142. Eiró N, González LO, Atienza S, González-Quintana JM, Beridze N et al. Prediction of metastatic breast cancer in non-sentinel lymph nodes based on metalloprotease-1 expression by the sentinel lymph node. *Eur J Cancer*. 2013; 49(5): 1009-17
143. Tallant C, Marrero A, Gomis-Rüth FX. Matrix metalloproteinases: fold and function of their catalytic domains. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1803(1): 20-8
144. Murphy G, Nagase H. Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol Aspects Med*. 2008; 29(5): 290-308
145. González-Ávila G, González A, Delgado J, Gutiérrez-González LH. Participación de las metaloproteasas de matriz en la progresión del cáncer. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*. 2009; 22(4): 328-36
146. Jozic D, Bourenkov G, Lim NH, Visse R, Nagase et al. X-ray structure of human proMMP-1: new insights into procollagenase activation and collagen binding. *J Biol Chem*. 2015; 280(10): 9578-85
147. Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci*. 2002; 115 (Pt 19): 3719-27
148. Hajitou A, Sounni NE, Devy L, Grignet-Debrus C, Lewalle JM et al. Down-regulation of vascular endothelial growth factor by tissue inhibitor of metalloproteinase-2: effect on in vivo mammary tumor growth and angiogenesis. *Cancer Res*. 2001; 61(8): 3450-7
149. Shim KN, Jung SA, Joo YH, Yoo K. Clinical significance of tissue levels of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in gastric cancer. *J Gastroenterol*. 2007; 42(2): 120-8

150. Remacle A, McCarthy K, Noël A, Maguire T, McDermott E et al. High levels of TIPM-2 correlate with adverse prognosis in breast cancer. *Int J Cancer*. 2000; 89(2): 118-21
151. Rodríguez D, Morrison CJ, Overall CM. Matrix metalloproteinases: What do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1803(1): 39-54
152. Ortega N, Behonick D, Stickens D, Werb Z. How proteases regulate bone morphogenesis. *Ann N Y Acad Sci*. 2003; 995: 109-16
153. Pulkoski-Gross AE. Historical perspective of matrix metalloproteases. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2015; 7: 125-49
154. Lamas M, Sándor GK. Enzymes, dentinogenesis and dental caries: a literature review. *J Oral Maxillofac Res*. 2014; 5(4): e3
155. González LO, Pidal I, Junquera S, Corte MD, Vázquez J et al. Overexpression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in mononuclear inflammatory cells in breast cancer correlates with metastasis-relapse. *Br J Cancer*. 2007; 97(7): 957-63
156. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001; 17: 463-516
157. Jodele S, Blavier L, Yoon JM, DeClerck YA. Modifying the soil to affect the seed: role of stromal-derived matrix metalloproteinases in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev*. 2006; 25(1): 35-43
158. Deryugina EI, Quigley JP. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 2006; 25(1): 9-34

159. González L, Eiró N, González LO, Andicoechea A, Barbón E et al. Effect of the expression of matrix metalloproteasas and their tissue inhibitors on survival of patients with resectable colorectal cancer. *Dig Dis Sci*. 2012; 57(8): 2063-71
160. Escaff S, Fernández JM, González LO, Suárez A, González-Reyes S et al. Collagenase-3 expression by tumor cells and gelatinase B expression by stromal fibroblast-like cells are associated with biochemical recurrence after radical prostatectomy in patients with prostate cancer. *World J Urol*. 2011; 29(5): 657-63
161. Altadill A, Rodríguez M, González LO, Junquera S, Corte MD et al. Liver expression of matrix metalloproteases and their inhibitors in hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis*. 2009; 41(10): 740-8
162. Eiró N, Fernández-García B, Vázquez J, Del Casar JM, González LO et al. A phenotype from tumor stroma based on the expression of metalloproteasas and their inhibitors, associated with prognosis in breast cancer. *Oncoimmunology*. 2015; 4(7): e992222. eCollection 2015
163. Fernández-García B, Eiró N, Marín L, González-Reyes S, González LO et al. Expression and prognostic significance of fibronectin and matrix metalloproteases in breast cancer metastasis. *Histopathology*. 2014; 64(4): 512-22
164. Roy R, Yang J, Moses MA. Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. *J Clin Oncol*. 2009; 27(31): 5287-97
165. Min KW, Kim DH, Do SI, Kim K, Lee HJ et al. Expression patterns of stromal MMP-2 and tumoural MMP-2 and -9 are significant prognostic factors in invasive ductal carcinoma of the breast. *APMIS*. 2014; 122(12): 1196-206

166. Wu ZS, Wu Q, Yang JH, Wang HQ, Ding XD et al. Prognostic significance of MMP-9 and TIMP-1 serum and tissue expression in breast cancer. *Int J Cancer*. 2008; 22(9): 2050-6
167. Sullu Y, Demirag GG, Yildirim A, Karagoz F, Kandemir B. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 expression in invasive ductal carcinoma of the breast. *Pathol Res Pract*. 2011; 207(12): 747-53
168. Kim GE, Lee JS, Choi YD, Lee KH, Lee JH et al. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in different immunohistochemical-based molecular subtypes of breast cancer. *BMC Cancer*. 2014; 14:959
169. Zhang B, Cao X, Liu Y, Cao W, Zhang F et al. Tumor-derived matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) correlates with poor prognoses of invasive breast cancer. *BMC Cancer*. 2008; 8:83
170. McGowan PM, Duffy MJ. Matrix metalloproteinase expression and outcome in patients with breast cancer: analysis of a published database. *Ann Oncol*. 2008; 19(9): 1566-72
171. García MF, González-Reyes S, González LO, Junquera S, Berdize N et al. Comparative study of the expression of metalloproteases and their inhibitors in different localizations within primary tumours and in metastatic lymph nodes of breast cancer. *Int J Exp Pathol*. 2010; 91(4): 324-34
172. Arratia J, Aguirre J. Los factores de transcripción tipo MYB, una familia de reguladores de la diferenciación celular conservada en los organismos eucariotas. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 2013; 16(2): 98-108

173. Yan Q, Moreland RJ, Conaway JW, Conaway RC. Dual roles for transcription factor IIF in promoter escape by RNA polymerase II. *J Biol Chem.* 1999; 274(50): 35668-75
174. Gil-Puig C, Blanco M, García-Caballero T, Segura C, Perez Fernández R. Pit-1/GHF-1 and GH expression in the MCF-7 human breast adenocarcinoma cell line. *J Endocrinol.* 2002; 173(1): 161-7
175. Xia YR, Andersen B, Mehrabian M, Diep AT, Warden CH et al. Chromosomal organization of mammalian POU domain factors. *Genomics.* 1993; 18(1): 126-30
176. Theill LE, Castrillo JL, Wu D, Karin M. Dissection of functional domains of the pituitary-specific transcription factor GHF-1. *Nature.* 1989; 342(6252): 945-8
177. Ben-Batalla I, Seoane S, Macia M, García-Caballero T, González LO et al. The Pit-1/Pou1f1 transcription factor regulates and correlates with prolactin expression in human breast cell lines and tumors. *Endocr Relat Cancer.* 2010; 17(1): 73-85
178. Cohen LE, Wondisford FE, Radovick S. Role of Pit-1 in the gene expression of growth hormone, prolactin, and thyrotropin. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1996; 25(3): 523-40
179. Gil-Puig C, Seoane S, Blanco M, Macia M, García-Caballero T et al. Pit-1 is expressed in normal and tumorous human breast and regulates GH secretion and cell proliferation. *Eur J Endocrinol.* 2005; 153(2): 335-44
180. Clevenger CV, Furth PA, Hankinson SE, Schuler LA. The role of prolactin in mammary carcinoma. *Endocr Rev.* 2003; 24(1): 1-27

181. Ben-Batalla I, Seoane S, García-Caballero T, Gallego R, Macia M et al. Deregulation of the Pit-1 transcription factor in human breast cancer cells promotes tumor growth and metastasis. *J Clin Invest*. 2010; 120(12): 4289-302
182. Sendón-Lago J, Seoane S, Eiro N, Bermudez MA, Macia M et al. Cancer progression by breast tumors with Pit-1-overexpression is blocked by inhibition of metalloproteinase (MMP)-13. *Breast Cancer Res*. 2014; 16(6): 505. 10.1186/s13058-014-0505-8
183. González LO, González-Reyes S, Marín L, González L, González JM et al. Comparative analysis and clinical value of the expression of metalloproteases and their inhibitors by intratumour stromal mononuclear inflammatory cells and those at the invasive front of breast carcinomas. *Histopathology*. 2010; 57(6): 862-76
184. Eiró N, Vizoso FJ. Inflammation and cancer. *World J Gastrointest Surg*. 2012; 4(3): 62-72
185. Ala-ahor R, Kähäri VM. Collagenases in cancer. *Biochimie*. 2005; 87(3-4): 27-86
186. Cady B. Regional lymph node metastases; a singular manifestation of the process of clinical metastases in cancer: contemporary animal research and clinical reports suggest unifying concepts. *Ann Surg Oncol*. 2007; 14(6): 1790-800
187. Irjala H, Alanen K, Grénman R, Heikkilä P, Joensuu H et al. Mannose receptor (MR) and common lymphatic endothelial and vascular endothelial receptor (CLEVER)-1 direct the binding of cancer cells to the lymph vessel endothelium. *Cancer Res*. 2003; 63(15): 4671-6
188. Kang Y, Siegel PM, Shu W, Drobnjak M, Kakonen SM et al. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell*. 2003; 3(6): 537-49

189. Brooks SA, Leathem AJ. Prediction of lymph node involvement in breast cancer by detection of altered glycosylation in the primary tumor. *Lancet*. 1991; 338(8759): 71-4
190. Wang Y, Klijn JG, Zhang Y, Sieuwerts AM, Look MP et al. Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet*. 2005; 365(9460): 671-9
191. Cochran AJ, Huang RR, Lee J, Itakura E, Leong SP et al. Tumour-induced immune modulation of sentinel lymph nodes. *Nat Rev Immunol*. 2006; 6(9): 659-70
192. Mansfield AS, Heikkila P, von Smitten K, Vakkila J, Leidenius M. Metastasis to sentinel lymph nodes in breast cancer is associated with maturation arrest of dendritic cells and poor co-localization of dendritic cells and CD8+ T cells. *Virchows Arch*. 2011; 459(4): 391-8
193. Thomas SN, Vokali E, Lund AW, Hubbell JA, Swartz MA. Targeting the tumor-draining lymph node with adjuvanted nanoparticles reshapes the anti-tumor immune response. *Biomaterials*. 2014; 35(2): 814-24
194. Vuylsteke RJ, Molenkamp BG, Gietema HA, van Leeuwen PA, Wijnands PG et al. Local administration of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor increases the number and activation state of dendritic cells in the sentinel lymph node of early-stage melanoma. *Cancer Res*. 2004; 64(22): 8456-60
195. Gur AS, Unal B, Johnson R, Ahrendt G, Bonaventura M et al. Predictive probability of four different breast cancer nomograms for nonsentinel axillary lymph node metastasis in positive sentinel node biopsy. *J Am Coll Surg*. 2009; 208(2): 229-35
196. Erb KM, Julian TB. Completion of axillary dissection for a positive sentinel node: necessary or not? *Curr Oncol Rep*. 2009; 11(1): 15-20

197. Fougo JL, Afonso M, Senhorães Senra F, Dias T, Leal C et al. Predictive factors for non-sentinel lymph node involvement in breast cancer patients with a positive sentinel node: should we consider sentinel node-related factors?. *Clin Transl Oncol.* 2009; 11(3): 165-71

198. Wada N, Imoto S, Yamauchi C, Hasebe T, Ochiai A. Predictors of tumour involvement in remaining axillary lymph nodes of breast cancer patients with positive sentinel lymph node. *Eur J Surg Oncol.* 2006; 32(1): 29-33

199. Abdessalam SF, Zervos EE, Prasad M, Farrar WB, Yee LD et al. Predictors of positive axillary lymph nodes after sentinel lymph node biopsy in breast cancer. *Am J Surg.* 2001; 182(4): 316-20

