

# CARCINOMA INVASOR DE LA MAMA

## ESTADIFICACIÓN MOLECULAR DEL GANGLIO CENTINELA

ARANZAZU MORENO ELOLA, JOSE MARÍA ROMAN SANTAMARÍA, ISABEL CAMPOS, MARÍA LUISA MAESTRO, MARTA VIDAURRETA, JOSÉ LUIS CARRERAS, VICENTE FURIO, CRISTINA FERNÁNDEZ, JOSÉ ANTONIO VIDART

HOSPITAL CLÍNICO SAN CARLOS DEPARTAMENTO DE GINECOLOGÍA UNIDAD DE PATOLOGÍA MAMARIA MADRID, ESPAÑA

### RESUMEN

Demostrar que existe un grupo de pacientes estadios patológicos N0 que presentan metástasis en el estudio del ganglio centinela no diagnosticados por métodos de rutina. El estudio del análisis molecular nos informa o no sobre el pronóstico, y podría considerarse como factor independiente. Se observó una relación agrupando los casos de mayor riesgo conocido, detectándose una población de bajo riesgo en la que se obviaría la quimioterapia. Observamos, que si agrupamos las pacientes con Ki-67 mayor de 5 %, la mayoría de los casos en las que se observaron micro metástasis estaban en este grupo; aceptamos una relación entre los dos factores pronóstico. Algo similar sucede con pacientes grado II y III; la relación con la existencia de micrometástasis es evidente, pudiendo aceptarse que existe un grupo de carcinomas de mama de menor agresividad; se plantea que estas pacientes no reciban tratamiento adyuvante, y no planificar tratamientos quirúrgicos agresivos.

**PALABRAS CLAVE:** Mama, cáncer, ganglio centinela, micrometástasis.

### SUMMARY

Demonstrated that exist a group of patients with pathological stage No who present metastases in the study of sentinel nodule no diagnostic for routine method. The study of molecular analysis inform or not about the prognosis and be considered a prognosis independent factor. We observed a relation between the mayor risk known cases and detected a low risk population in which obviated the chemotherapy. We observed that grouped patients with Ki-67 raised of 5 % the majority of the cases in which observed micro metastases were in these group; we accepted a relationship between this two prognosis factors. Some similar occur with patient's grade II and grade III; the relation with the existence of micro metastases is evident, and we accepted that exist a group of breast carcinoma of less aggressive; for these reason we planted that these patient does not receive adjuvant treatment, and no planned surgical aggressive treatment.

**KEY WORDS:** Breast, cancer, sentinel nodule, micro metastases.

### INTRODUCCIÓN

# L

a técnica del ganglio centinela en el carcinoma de mama estadios I y II, es ya una técnica definitiva: sólo en el caso de que el ganglio centinela resulte positivo para tumor, se realiza la disección axilar.

La principal tarea para el anatomopatólogo es investigar posibles metástasis en el ganglio centinela. Esta investigación debe ser realizada

---

Recibido: 09/03/2007 Revisado: 16/03/2007

Aceptado para publicación: 23/03/2007

Correspondencia: Dra. Aranzazu Moreno. Hospital Clínico San Carlos. Departamento de Ginecología. Unidad de patología mamaria. A Martín Lagos S/N 28040 Madrid.

E-mail amorenoelola@yahoo.es

---

aun con más atención de la usual, puesto que un falso negativo puede hacer que se omita la disección axilar y por tanto no lograr un buen control locorregional, objetivo primordial de la cirugía. Además, es importante que el análisis del ganglio centinela se haga intra-operatoriamente, así si hubiera que realizar la disección axilar, sería en la misma intervención<sup>(1-8)</sup>. Sin embargo, la inmunohistoquímica, citometría de flujo y análisis de biología molecular requieren más tiempo, por lo que se hacen pos cirugía<sup>(9,10)</sup>.

Para estudiar el ganglio centinela existen varios métodos

#### Morfológicos

##### Histología clásica (H/E).

1. Inmunohistoquímica.
2. Análisis de secciones seriadas múltiples congeladas
3. Citologías

##### No morfológicos

4. Citometría de flujo
5. Análisis molecular

El estudio del ganglio centinela utilizando análisis molecular: la técnica de RT-PCR, consiste en detectar micro metástasis ampliando mRNA que se expresa en las células tumorales, mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Estas moléculas de mRNA deben ser específicas de células tumorales, no deben existir en células propias del ganglio.

Diferentes estudios han evaluado el estudio de la RT-PCR para este propósito: Schults y col. compararon keratina 19 RT-PCR con los resultados histopatológicos en ganglios linfáticos de pacientes diagnosticadas de cáncer de mama<sup>(7)</sup>. De 39 ganglios que histológicamente eran negativos, 14 fueron positivos con RT-PCR. Vannucchi y col. <sup>(8)</sup>, compararon MUC 1 con keratina 19 RT-PCR y encontraron que los 10 ganglios que fueron positivos con histología

también lo fueron con RT-PCR y 8 que habían resultado negativo con RT-PCR se comprobó que había micro metástasis.

Se han investigado diferentes marcadores mRNA de células tumorales para averiguar cuales son los más fiables en la detección de micro metástasis en un ganglio centinela: en el cáncer de mama, por ejemplo la CK19 y la 20; en el melanoma, los genes 1 y 3.

Bostick y col.<sup>(6)</sup>, en su experiencia, encuentran que la RT-PCR puede ser más sensible que la histología para detectar micro metástasis. Mitas y col.<sup>(1)</sup>, comparando 146 ganglios centinela de 123 pacientes con cáncer de mama, estudiados con histopatología o con RT-PCR y utilizando 5 marcadores para RT-PCR, demuestran que cada marcador individualmente no aumenta la sensibilidad, pero combinados si hacen que la RT-PCR sea más sensible que la histología.

## OBJETIVOS DEL ESTUDIO PLANTEADO

### PRIMARIOS

1. Describir la técnica empleada en este estudio.
2. Comparar la sensibilidad de los métodos en nuestro medio: H/E, PCR.

### SECUNDARIOS

1. Valoración de la indicación de la incorporación de la técnica de análisis de PCR en el estudio rutinario del carcinoma de mama.

## HIPÓTESIS DE TRABAJO

1. PRIMERA FASE: demostrar que existe un grupo de pacientes estadio patológico N0 que presentan metástasis en el estudio de PCR no diagnosticadas por métodos de rutina lo que implica un cambio en la estadificación final.

2. SEGUNDA FASE: demostrar la implicación del diagnóstico de metástasis axilares por PCR en el pronóstico tumoral en términos de supervivencia y tiempo libre de enfermedad.

## MÉTODOS

### SUJETOS DE ESTUDIO SELECCIÓN DE LAS PACIENTES

Para que satisfagan los criterios de inclusión en la biopsia del ganglio centinela las pacientes deberán ser menores de: 75 años y IMC (índice de masa corporal) menor de: 35 es decir, se desecharán las pacientes de edad avanzada o las obesas por el bajo índice de detección del ganglio centinela en estas pacientes.

Se recogerá un consentimiento informado de cada paciente incluida en el estudio consentimiento informado. Todas deben recibir tratamiento quirúrgico primario por carcinoma de mama, sea conservador o radical, por lo que se desecharán las pacientes que reciban quimioterapia neoadyuvante. La clasificación de las pacientes según su estadio se basará en el sistema del AJCC (*American Joint Committee on Cancer*), para lo cual se acudirá tanto a la información clínica como al estudio anatomopatológico rutinario. Se incluirán las pacientes con estadio clínico T1N0, T2N0, es decir, carcinomas invasores menores o iguales a 50 mm sin afectación clínica axilar.

## TÉCNICA

### MEDICINA NUCLEAR

El día previo a la intervención quirúrgica se realizará la inyección con Tecnecio 99 m por el servicio de medicina nuclear, como está estandarizado en la unidad de patología mamaria

del departamento de obstetricia y ginecología del Hospital Clínico San Carlos.

### Técnica

- Ubicación: servicio de medicina nuclear, Hospital Clínico San Carlos
- Tiempo: la inyección se realiza 18-24 horas antes de la cirugía.
- Dosis: 0,1 mCi de Tc 99m
- Localización: periareolar, intradérmica.
- Gammagrafía de comprobación 16 a 18 horas tras la punción. Comprobación de la migración del coloide radiactivo hasta la axila. Contaje de número de ganglios centinela.

### CIRUGÍA

Inyección de azul de metileno

Resección del ganglio centinela

Biopsia intra-operatoria del ganglio centinela

### ANATOMÍA PATOLÓGICA

Cada ganglio es seccionado en 4 partes, y cada una identificada para el análisis posterior:

1. Estudio diferido del ganglio centinela: hematoxilina-eosina (de rutina)
2. Estudio diferido del ganglio centinela: inmunohistoquímica (estudio financiado)
3. Estudio de micro-angiogénesis tumoral en el ganglio centinela (estudio financiado)

**GENÉTICA MOLECULAR** (Cuarta sección del ganglio centinela)

### PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO DE TEJIDOS EMBEBIDOS EN PARAFINA

El protocolo describe la separación de la

parafina por extracción con xileno. La muestra de tejido es luego procesado de acuerdo con el QIAamp DNA Mini *Tissue Protocol*.

1. Poner una pequeña sección (no más de 25 mg) de tejido embebido en parafina en un tubo de micro centrífuga de 2 mL.
2. Añadir 1 200  $\mu$ L de xileno y esperar durante 2 horas, durante este tiempo agitar en *vortex* vigorosamente cada 30 minutos.
3. Centrifugar a 14 000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente.
4. Separar el sobrenadante con la pipeta. **No remover nada del pellet.**
5. Añadir 1200  $\mu$ L de etanol (96 %-100 %) al *pellet* para trasladar el xileno residual y mezclar despacio con *vortex*.
6. Centrifugar a 14 000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente.
7. Cuidadosamente separar el etanol con la pipeta. **No remover nada del pellet.**
8. Repetir los pasos 5-7 dos veces a concentraciones decrecientes de etanol (85 % y 70 %).
9. Incubar en un tubo de micro fuga abierto a 37° C durante 10-15 minutos mientras el etanol se evapora.
10. Suspender el *pellet* de tejido en 180  $\mu$ L de buffer ATL y seguir el protocolo de tejido desde el paso 2.

Guardar el DNA extraído en buffer AE a -20° C; DNA guardado en agua está sujeto a hidrólisis ácida.

## CUANTIFICACIÓN DNA

Medir la absorbencia a 260 nm, el valor debe encontrarse entre 0,15-1,0; en caso contrario diluir la muestra.

CONCENTRACIÓN DNA = 50  $\mu$ g/mL  $\cdot$  A<sub>260 nm</sub>  $\cdot$  Factor dilución

$$\text{PUREZA} = A_{260 \text{ nm}} / A_{280 \text{ nm}} = 1,8 - 2,0$$

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables cualitativas se presentan con su distribución de frecuencias y su intervalo de confianza exacto al 95 %, según la distribución binomial. Las variables cuantitativas se resumen en su media y desviación estándar (DE) junto a su intervalo de confianza al 95 %.

Se evalúa la asociación entre variables cualitativas con el test de Chi cuadrado o prueba exacta de Fisher, en el caso de que más de un 25 % de los esperados fueran menores de 5. En el caso de variables ordinales se contrastará la hipótesis de tendencia ordinal de proporciones. Se estimará el riesgo relativo junto a su intervalo de confianza al 95 % según el método de Cornfield.

Se analiza el comportamiento de la variables cuantitativas por cada una de las variables independientes categorizadas mediante el test de la t de Student (en comparaciones de una variable con dos categorías) y/o el análisis de la variancia (ANOVA). Mediante esta técnica se evalúan las diferencias de medias debido al efecto individual, o principal de cada factor y/o al efecto de sus interacciones.

En todos los casos se comprobó la distribución de la variable frente a los modelos teóricos y se contrastará la hipótesis de homogeneidad de variancias.

En todos los contrastes de hipótesis se rechazará la hipótesis nula con un error de tipo I o error alfa menor a 0,05.

El paquete informático utilizado para el análisis será SPSS para Windows Microsoft® versión 11.0.

## RESULTADOS

La muestra la constituyen 121 ganglios centinela de 96 casos de carcinoma invasor

mamario. No se incluyeron las pacientes con migración negativa o no satisfactoria (más de 5 ganglios centinela). Sólo se incluyeron los casos en que el estudio anatomopatológico no reveló la existencia de metástasis, tanto por tinción con hematoxilina-eosina como por inmunohistoquímica. No se incluyeron tampoco las pacientes con micro metástasis en ninguna de las dos técnicas.

La edad mediana de las pacientes fue de 51 años (rango=34-72). La mayor parte de las pacientes fueron posmenopáusicas (65 %) sin tratamiento hormonal sustitutivo (los 85 % de las pacientes posmenopáusicas).

En cuanto a la lesión, fue más frecuentemente no palpable (74 %), detectada por la mamografía como una lesión espiculada (35 % de las lesiones radiológicas) o microcalcificaciones (61 % de las lesiones radiológicas). En el 4 % de los casos la lesión no se objetivó en la mamografía y sí en la ecografía.

El tumor fue de tipo ductal invasor en el 84 % de los casos, correspondiendo a lesión multicéntrica en el 6 %. Se procedió a cirugía conservadora en el 58 % de los casos.

En esta fase del estudio hemos incluido 96 ganglios centinela que resultaron negativos de malignidad en el estudio anatomopatológico inicial de hematoxilina-eosina.

Las piezas se han recolectado en quirófano directamente, procediéndose a la inclusión en la solución de guanidina (RNA STAT-60). (Figura 1 y 2).

Cada ganglio se analizó de forma separada, incluyendo la totalidad del RNA, realizándose el estudio en tiempo real. Todo el material utilizado corresponde al material fungible facturado en este estudio.

El estudio de RNA-RT en tiempo real incrementó la sensibilidad del estudio de 89 % a 93,5 % ( $P=0,021$ ) y la fiabilidad diagnóstica mejoró del 95,5 % al 98,7 % ( $P=0,031$ ).

Se produjo un aumento en el diagnóstico de

metástasis axilares del 0 % (hematoxilina-eosina) al 14 % (RNA-RT) ( $P=0,0023$ ).

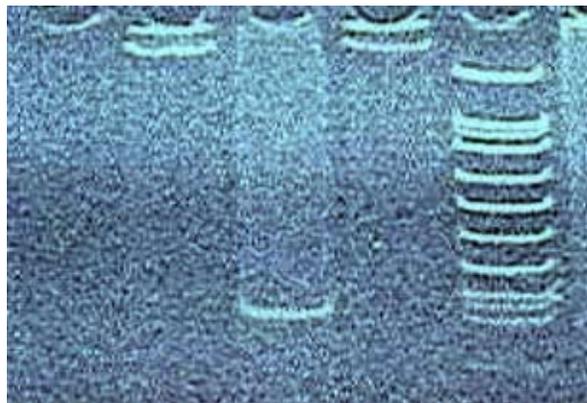


Figura 1. Amplificación de RNA.

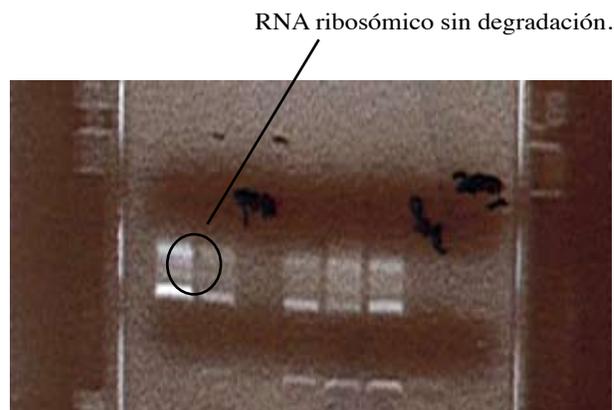


Figura 2. RNA.

## DISCUSIÓN

Las características demográficas demostraron que esta población podría ser representativa de la población general. A pesar de las ya planteadas limitaciones del estudio, la sensibilidad, la fiabilidad y el valor predictivo negativo han resultado similares a los conocidos en la literatura (11-15).

Se ha demostrado que la supervivencia de las pacientes es mayor en ciertos casos si se administra quimioterapia adyuvante (15 % vs. 4 %). La pregunta es: ¿qué pacientes son las que se benefician y cuáles las que sólo sufren los efectos secundarios? La existencia de micro metástasis en el ganglio centinela implicaría el paso de células por la primera estación ganglionar, con la posibilidad de afectación secundaria en un futuro, la cual no se objetiva en el momento del diagnóstico del tumor primario.

Existe un interés creciente en demostrar micrometástasis axilares desde que se han incluido en la estadificación TNM (AJCC) las micrometástasis mayores de 0,2 mm incluso siendo detectadas por técnicas no rutinarias. Sin embargo, el significado pronóstico de las pacientes sin metástasis en el estudio por hematoxilina-eosina, y con micro metástasis por inmunohistoquímica o por técnicas moleculares, es desconocido, y su manejo es muy controvertido.

El estudio biomolecular permite la detección de micrometástasis mediante una técnica más fiable que las aportadas por la anatomía patológica, y los resultados que presentamos son similares a otros en la literatura. El estudio inmunohistoquímico consiguió aumentar el porcentaje de pacientes con afectación axilar, pero el estudio molecular fue claramente más eficaz<sup>(16)</sup>.

El problema al que nos enfrentamos es la necesidad de plantear tratamientos agresivos a estas pacientes. Primero es necesario conocer

su capacidad predictiva del riesgo de recidiva y muerte, y su correlación con otros factores pronósticos conocidos<sup>(17,18)</sup>.

La posibilidad de aumentar el número de falsos positivos desaparece al utilizar la técnica en tiempo real, lo cual permite cuantificar la expresión génica de base para conseguir los umbrales de positividad apropiados.

En cuanto a los factores pronóstico, no se observó relación entre el resultado del análisis PCR y el grado de malignidad, el *cerB2-neu*, la presencia de positividad para los receptores hormonales, el porcentaje de Ki-67, el tipo de cirugía, o la edad de la paciente en el momento del diagnóstico. Ello no quiere decir que el estudio PCR informe o no sobre el pronóstico, si no que podría ser un factor pronóstico independiente. Además, si se observó relación agrupando los casos de mayor riesgo conocido, detectándose por lo tanto una población de bajo riesgo en la que se obviaría la quimioterapia.

Así observamos, que si agrupamos las pacientes con Ki-67 mayor de 5 %, la mayor parte de los casos en que se observaron micrometástasis estaban en ese grupo, por lo cual podemos aceptar una relación entre los dos factores pronóstico.

Algo similar observamos con las pacientes grado II y grado III cuando fueron agrupadas; la relación con la existencia de micrometástasis es evidente, pudiendo aceptar que existe un grupo de carcinomas de mama de menor agresividad; no sólo para plantear que estas pacientes no reciban tratamiento adyuvante, si no para planificar tratamientos quirúrgicos menos agresivos.

---

## REFERENCIAS

1. Mitas M, Mikhitarian K, Walters C, Baron PL, Elliott BM, Brothers TE, et al. Quantitative real-time RT-PCR detection of breast cancer micro metastasis using a multigene marker panel. *Int J Cancer*. 2001;93:162-171.
2. Taback B, Hashimoto K, Kuo CT, Chan A, Giuliano AE, Hoon DS. Molecular lymphatic mapping of the sentinel lymph node. *Am J Pathol*. 2002;161:1153-1161.
3. Sakaguchi M, Virmani A, Dudak MW, Peters GN, Leitch AM, Saboorian H, et al. Clinical relevance of reverse

- transcriptase-polymerase chain reaction for the detection of axillary lymph node metastases in breast cancer. *Surg Oncol.* 2003;10:117-1125.
4. Baker M, Gillanders WE, Mikhitarian K, Mitas M, Cole DJ. The molecular detection of micro metastatic breast cancer. *Am J Surg.* 2003;186:351-358.
  5. Min CJ, Tafra L, Verbanac KM. Identification of superior markers for polymerase chain reaction detection of breast cancer metastases in sentinel lymph nodes. *Cancer Res.* 1998;58:4581-4584.
  6. Bostick PJ, Huynh KT, Sarantou T, Turner RR, Qi K, Giuliano AE, et al. Detection of metastases in sentinel lymph nodes of breast cancer patients by multiple-marker RT-PCR. *Int J Cancer.* 1998;79:645-651.
  7. Schulze R, Schulze M, Wischnik A, Enhle S, Doukask K, Behr W, et al. Tumor cell contamination of peripheral blood stem cell transplants and bone marrow in high-risk breast cancer patients. *Bone Marrow Transplant.* 1997;19:1223-1228.
  8. Vannucchi AM, Bosi A, Glinz S, Pacini P, Linari S, Saccardi R, et al. Evaluation of breast tumors cell contamination in the bone marrow and leukopheresis collections by RT-PCR for cytokeratin-19 mRNA. *Br Haematol.* 1998; 103:610-617.
  9. Jung R, Kruger W, Hosch S, Holweg M, Kröger N, Gutensohn I, et al. Specificity of reverse transcriptase polymerase chain reaction assays designed for the detection of circulating cancer cells is influenced by cytokines in vivo and in vitro. *Br J Cancer.* 1998;78:1194-1198.
  10. Jung R, Petersen K, Kruger W, Wolf M, Wagener C, Zander A, et al. Detection of micro metastasis by cytokeratin 20 RT-PCR is limited due to stable background transcription in granulocytes. *Br J Cancer.* 1999;81:870-873.
  11. Ruud P, Fodstad O, Hovig E. Identification of a novel cytokeratin 19 pseudogene that may interfere with reverse transcriptase polymerase chain reaction assays used to detect micro metastatic tumor cells. *Int J Cancer.* 1999;80:119-125.
  12. Dent GA, Civalier CJ, Brecher ME, Bentley SA. MUC1 expression in hematopoietic tissues. *Am J Clin Pathol.* 1999;111:741-747.
  13. Schleiermacher G, Delattre O. Detection of micro metastasis and circulating tumor cells using molecular biology techniques in solid tumors. *Bull Cancer.* 2001;88:561-570.
  14. Hildebrandt M, Mapara MY, Korner IJ, Bargou RC, Moldenhauer G, Dorken B. Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)-controlled immunomagnetic purging of breast cancer cells using the magnetic cell separation (MACS system: a sensitive method for monitoring purging efficiency. *Exp Hematol.* 1997;25:57-65.
  15. Eaton MC, Hardingham JE, Kotasek D, Dobrovic A. Immunobead RT-PCR: A sensitive method for detection of circulating tumor cells. *Biotechniques.* 1997;22:100-105.
  16. Battaglia M, Pedrazzoli P, Palermo B, Lanza A, Bertolini F, Gibelli N, et al. Epithelial tumor cell detection and the unsolved problems of nested RT-PCR: A new sensitive one step method without false positive results. *Bone Marrow Transplant.* 1998;22:6128.
  17. Baun S, Schlimok G, Heumos I, Schaller G, Riethdorf L, Riethmuller C, et al. erbB2 overexpression on occult metastatic cells in bone marrow predicts poor clinical outcome of stage I-III breast cancer patients. *Cancer Res.* 2001;61:1890-1895.
  18. Gerber B, Krause A, Muller H, Ritcher D, Reimer T, Makoviszky J, et al. Simultaneous immunohistochemical detection of tumor cells in lymph nodes and bone marrow aspirates in breast cancer and its correlation with other. *J Clin Oncol.* 2001;19:1468-1475.