

DETECCIÓN DE METÁSTASIS EN GANGLIO CENTINELA DE CARCINOMA MAMARIO MEDIANTE CITOLOGÍA INTRAOPERATORIA, HISTOPATOLOGÍA Y TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Dres. Daniela Allende, Valeria Denninghoff, Fernando Paesani, Alejandra Avagnina, Eduardo Ábalo, Gabriel Crimi, Boris Elsner.

RESUMEN

Introducción: El estudio del ganglio centinela (GC) en cáncer de mama es una técnica que permite la evaluación del estado axilar de la paciente. El objetivo de este estudio es desarrollar una técnica de biología molecular (BM) para la detección de micrometástasis y hallar un perfil clínico-quirúrgico en las pacientes con GC que expresen mamaglobina.

Métodos: Entre junio de 2004 y diciembre de 2005 se estudiaron prospectivamente 17 GC de pacientes con tumores mamarios menores y/o iguales a 2 cm, sin adenopatías axilares palpables. Se realizó citología intraoperatoria, técnicas de hematoxilina-eosina (HE), inmunohistoquímica (IHQ) y BM para determinar mamaglobina (MAG) A y B.

Resultados. El estudio con las técnicas de rutina mostró la presencia de metástasis en 2/16 casos. Se detectaron 3/16 casos con IHQ, uno de ellos negativo para HE. Mediante BM se detectaron 6/16 GC positivos, que incluían los 3 casos anteriormente mencionados.

Conclusiones. Las técnicas de IHQ y BM permiten aumentar la detección de micrometástasis. No hallamos correlación entre los parámetros clínicos evaluados, las características del tumor y la presencia del marcador molecular. Estas técnicas quizás permitan en un futuro cercano modificar la estadificación y tratamiento de las pacientes con cáncer de mama.

Palabras clave: Cáncer de mama. Ganglio centinela. Biología molecular. Mamaglobina.

SUMMARY

Introduction: Breast cancer sentinel lymph node (SLN) study allows a proper analysis of patients' axillary status. The purpose of this study was to develop molecular biology techniques (MBT) for micrometastasis detection, to determine patients' clinical and pathological features of SLN expressing mammaglobin.

Methods: Sentinel lymph nodes from 16 patients with a diagnosis of breast cancer were prospectively studied between June 2004 and December 2005. Breast tumors lower than or equal to 2 cm, with no palpable axillary adenopathies were included. Lymph nodes were all examined by intraoperative cytology, hematoxylin-eosin (HE), immunohistochemistry (IHC), and MBT were used to determine mammaglobin (MAG) A and B presence.

Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas (CEMIC), Buenos Aires, Argentina.

Dra. Daniela Allende: Jefe de Residentes del Servicio de Patología.

Dra. Valeria Denninghoff: Responsable Laboratorio Patología Molecular del Servicio de Patología.

Dr. Fernando Paesani: Jefe de Residentes del Departamento de Ginecología y Obstetricia.

Dra. Alejandra Avagnina: Jefe del Servicio de Patología.

Dr. Eduardo Ábalo: Jefe de la Sección de Ginecología Oncológica y Mastología del Departamento de Ginecología y Obstetricia.

Dr. Gabriel Crimi: Médico del Departamento de Ginecología y Obstetricia.

Dr. Boris Elsner: Médico Consultor del Servicio de Patología.

Correo electrónico para la Dra. Valeria Denninghoff: vdenninghoff@cemic.edu.ar

Results: Conventional techniques showed metastases in 2/16 cases. We found 3/16 cases by IHC, one of them negative by HE. Molecular biology techniques revealed 6/16 positive SLN, which comprised the 3 above mentioned cases.

Conclusions: Detection of micrometastases was increased by IHC and MBT. There is no correlation between clinical findings, tumor features and molecular marker detection. The use of these techniques could potentially modify staging and treatment of breast cancer patients.

Key words: Breast cancer. Sentinel node. Molecular biology. Mammaglobin.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es el primer tumor en frecuencia a escala mundial en mujeres y representa el 22% de todas las neoplasias femeninas.¹ El estado axilar junto al tamaño tumoral continúan siendo los factores de pronóstico más importantes. El compromiso de los ganglios axilares está íntimamente relacionado con la supervivencia y recurrencia de la enfermedad, y tiene implicancias en el tratamiento adyuvante.²⁻⁴ La linfadenectomía axilar fue y continúa siendo, en determinadas pacientes, parte del tratamiento quirúrgico conservador del cáncer de mama. Esta técnica presenta diversas complicaciones posquirúrgicas, como el linfedema crónico, que se puede observar hasta en un 37% de las pacientes. También debe considerarse que entre un 60% a 70% de esas linfadenectomías son negativas en el examen histopatológico por diferido.⁵ La presencia de metástasis, en la mayoría de los casos, es un proceso secuencial y continuo, que comienza con el crecimiento del tumor primario. Las células tienden a penetrar el sistema linfático al nivel de los pequeños sáculos iniciales de los capilares linfáticos, a través de pequeños poros entre las células endoteliales. Los ganglios linfáticos permiten a las células pasar o ser retenidas temporaria o permanentemente. Por lo tanto, la habilidad para detectar las células metastásicas en los ganglios linfáticos es importante porque determina el estadio, la terapia adyuvante y los procedimientos de seguimiento.⁶ Basándose en esta última premisa, se estableció el conocimiento del estado de los ganglios linfáticos regionales en individuos con tumores sólidos co-

mo uno de los factores de pronóstico más relevante.⁷ El primer ganglio en el trayecto principal entre el tumor primario y el grupo ganglionar regional, habitualmente es el sitio de asentamiento más probable y a menudo exclusivo de metástasis temprana. Morton y col. desarrollaron en 1992 un método denominado linfadenectomía selectiva que consiste en la identificación del primer ganglio que recibe drenaje linfático del área del tumor y que fue llamado ganglio centinela (GC).⁸ Su identificación permite el estudio minucioso de metástasis subclínicas en el examen anatomopatológico. En los últimos años varios estudios han validado la búsqueda del GC de mama.⁹⁻¹² Debe entenderse por GC de mama a aquel o aquellos ganglios linfáticos a los cuales drena inicialmente el tumor mamario.¹³ Análogamente a lo descrito en el estudio del GC para tumores como el melanoma maligno cutáneo, esta técnica permite una evaluación certera y confiable del estado axilar.¹⁴ La identificación intraoperatoria del GC permite la detección de metástasis en el examen anatomopatológico, seleccionando los pacientes que se beneficiarán con el tratamiento quirúrgico y adyuvante. En la actualidad somos capaces de determinar metástasis, micrometástasis (entre 0,2 y 2,0 mm), submicrometástasis (<0,2 mm) y células neoplásicas aisladas. El hecho de que estas categorías hayan sido incluidas en la última estadificación TNM del American Joint Committee impulsa el empleo de nuevas técnicas, más sensibles que las anteriores, en la búsqueda de células tumorales en el GC de mama. Las técnicas de biología molecular (BM) para la determinación de metástasis en GC de mama abren un nuevo ho-

rizonte de posibilidades en el estudio, diagnóstico y tratamiento de estas pacientes, así como también plantean diversos interrogantes con relación a su implicancia. El primer desafío en este campo fue encontrar un marcador lo suficientemente sensible y específico. Se postularon infinidad de marcadores, entre los que se mencionan CEA, PIP, CK19, muc1, PSE, mamaglobina (MAG) A y MAG-B.¹² De todos ellos MAG-A fue el mejor marcador individual por su alta especificidad y sensibilidad.^{10,12,15} Grandes estudios han mostrado desventajas en la supervivencia de pacientes con micrometástasis en ganglios axilares.^{15,16} El significado pronóstico de determinar la presencia de colgajos celulares y células neoplásicas aisladas continúa aún sin consenso.¹⁷

El objetivo de este estudio es desarrollar una técnica molecular para la detección de micrometástasis y hallar un perfil clínico-quirúrgico en las pacientes con GC que expresen mamaglobina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Entre junio de 2004 y diciembre de 2005, fueron estudiados en forma prospectiva los GC de 16 pacientes con diagnóstico de cáncer de mama, intervenidas quirúrgicamente en CEMIC. Se incluyeron los tumores mamarios menores y/o iguales a 2 cm, sin ganglios axilares palpables. La media de edad al diagnóstico fue de 57 años (rango: 41-77 años). La media de seguimiento fue de 10 meses (rango: 5-16 meses). La media del tamaño tumoral fue de 0,82 cm (rango: 0,01-1,80 cm). Se consideraron otros datos como el tipo y grado histológico, los receptores hormonales, el estado del HER-2/neu, el estado de los márgenes y la invasión linfocelular del tumor primario. También se evaluaron la edad de menopausia, la edad de menarca, el estado hormonal (pre- o posmenopáusicas), los embarazos y partos, la presencia de cáncer de mama contralateral, los antecedentes familiares, los antecedentes personales y la in-

gesta de alcohol al momento del diagnóstico del cáncer de mama. Durante el acto operatorio se inyectaron 3 ml de azul patente al 3% con aguja 25 gauge, en región subareolar, realizando a continuación un masaje suave para movilizar el colorante en los linfáticos. Luego de un tiempo variable de espera, que osciló entre 10 y 20 minutos, se realizó una pequeña incisión sobre el área axilar. El diseño de la misma debe ser tal que permita ampliarse en caso de ser necesario un vaciamiento ganglionar. Identificado el o los ganglios teñidos de azul, se extraen para realizar el estudio anatomopatológico. Los GC reseca- dos fueron estudiados intraoperatoriamente según su tamaño: si eran pequeños fueron hemiseccionados y si eran de un tamaño mayor se obtuvieron lonjas finas de aproximadamente 2 mm. Se realizó la impronta de las superficies de corte resultantes y se colorearon con azul de toluidina. La evaluación se realizó mediante estudio citológico.¹⁸ Una lonja central fue conservada en nitrógeno líquido (a -196° centígrados) para BM y el resto del GC se fijó en formol-buffer al 10% e incluyó en parafina. Del taco de parafina se realizaron cortes seriados de 3 micrones para hematoxilina-eosina (HE) y estudio inmunohistoquímico (IHQ), con la utilización de anticuerpos monoclonales anticitoqueratina (CK) clon AE1 y AE3 (DAKO, dilución 1:100).^{19,20} Los cortes fueron incubados con el suero primario, utilizándose luego el sistema avidina-biotina, con el kit Vectastain Elite (Vector Labs, Burlingame, EE.UU.). Como cromógeno se utilizó diaminobencidina y como contraste hematoxilina. Se efectuaron los controles positivos y negativos correspondientes. A partir del RNA mensajero (RNAm) extraído de los fragmentos de tejido en fresco del GC utilizando SV Total RNA Isolation system (Promega Corporation, Madison, WI, EE.UU.), se realizó una retrotranscripción (RT). El DNA complementario (DNAc) obtenido fue amplificado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en el mismo tubo de reacción (RT-PCR múltiplex) usando *primers*

específicos. Los *primers* de MAG-A humana amplificaron un producto de 331 pares de bases (pb) y MAG-B un producto de 245 pb. La integridad del RNAm se verificó mediante la amplificación de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPD). Los *primers* usados fueron GAPD-1 y GAPD-2 que amplifican un producto de 315 pb.²¹ Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en un gel de poliácridamida al 9% con tinción con bromuro de etidio bajo luz UV. Se consideró como resultado positivo la presencia de bandas de 331/245 pb para RNAm de MAG-A/B humana, respectivamente.

RESULTADOS

El estudio diferido con HE mostró la presencia de metástasis subcapsular en 2/16 casos (Figura 1). Se detectaron 3/16 casos con IHQ, uno de ellos negativo para HE, donde se observaron escasas células neoplásicas aisladas o en pequeños grupos, ubicadas a nivel del seno subcapsular o entremezcladas en el tejido linfoidal. Las células tumorales encontradas en la región subcapsular o en el parénquima linfático fueron positivas con CK-AE1-AE3 en todos los casos mencionados (Figura 2). Mediante BM se detectaron 6/16 GC positivos, que incluían los 3 casos anteriormente mencionados. En los 3/16 GC restantes detectados sólo con BM, todos expresaban MAG-B exclusivamente. Las demás formaciones ganglionares estudiadas (10/16) no mostraron metástasis con ninguno de los métodos implementados para el estudio (Tabla I). En todas las muestras se obtuvo material amplificable. Todos los controles dieron los resultados esperados. El tipo histológico de las 16 pacientes se distribuyó de la siguiente manera: 8 con carcinoma ductal infiltrante; 4 lobulillar; 2 tubular, 1 túbulo-lobulillar; y 1 medular atípico. No existieron diferencias significativas entre las poblaciones de las pacientes con GC BM positivos o con GC triple negativos (HE-/IHQ-/BM-) en la media de edad al diagnóstico, la me-

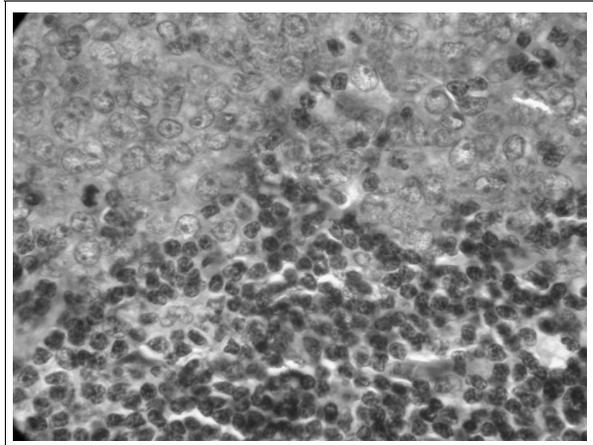


Figura 1. Se observan células neoplásicas metastásicas de localización subcapsular (HE - 250x).

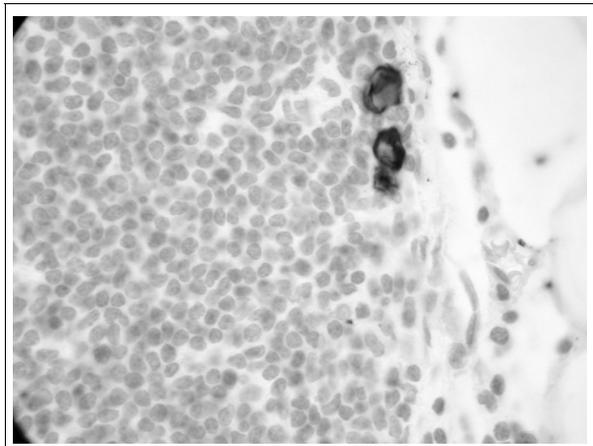


Figura 2. Se observan células neoplásicas metastásicas positivas con CK-AE1-AE3 (250x).

dia de edad de menopausia, la media de edad de menarca, los embarazos y partos, el estado hormonal (premenopáusicas o posmenopáusicas), la presencia de cáncer de mama contralateral, la media de tiempo de seguimiento, el tipo histológico, la media de tamaño tumoral y la historia familiar de cáncer de mama. En nuestra población no encontramos relación entre los resultados hallados en los GC con los antecedentes personales y la ingesta de alcohol. Los márgenes del tumor en todos los casos estaban libres de lesión. Como se puede ver en la Tabla I,

Caso	HE	IHQ	MAG-A	MAG-B	RH	HER-2/neu
1	Pos	Pos	Pos	Pos	E+; P+	Positivo +++
2	Pos	Pos	Pos	Neg	E+; P-	Positivo +++
3	Neg	Pos	Pos	Neg	E+; P+	Negativo
4	Neg	Neg	Neg	Pos	E+; P-	Negativo
5	Neg	Neg	Neg	Pos	E+; P-	Negativo
6	Neg	Neg	Neg	Pos	E+; P+	Negativo
7	Neg	Neg	Neg	Neg	E+; P+	Negativo
8	Neg	Neg	Neg	Neg	E+; P+	Negativo
9	Neg	Neg	Neg	Neg	E+; P+	Negativo
10	Neg	Neg	Neg	Neg	E+; P+	Negativo
11	Neg	Neg	Neg	Neg	E+; P+	Negativo
12	Neg	Neg	Neg	Neg	E+; P+	Negativo
13	Neg	Neg	Neg	Neg	E+; P+	Positivo +++
14	Neg	Neg	Neg	Neg	E+; P+	Positivo débil ++
15	Neg	Neg	Neg	Neg	E+; P+	Positivo débil ++
16	Neg	Neg	Neg	Neg	E+; P+	Negativo

Neg: Negativo. Pos: Positivo. HE: Hematoxilina eosina. IHQ: Inmunohistoquímica. MAG: Mamaglobina. RH: Receptores hormonales. E: Receptores de estrógeno. P: Receptores de progesterona.

Tabla I. Detección de micrometástasis en ganglios linfáticos centinela de pacientes con cáncer de mama (histopatología, inmunohistoquímica y biología molecular).

no se encontró relación entre los resultados de HE, IHQ y BM, con los receptores hormonales y/o el estado del HER-2/neu. Ninguno de los tumores con micrometástasis detectados por BM presentaba invasión linfovascular.

DISCUSIÓN

El cáncer de mama produce metástasis ganglionares axilares en un alto porcentaje de las pacientes. Hasta un 30% de las pacientes con ganglios linfáticos negativos estudiadas con HE tienen recurrencias dentro de los 10 años. El estudio retrospectivo con cortes seriados ha revelado metástasis en hasta un 30% de los casos.¹⁷ Estas metástasis ocultas tienen un impacto sumamente negativo en el pronóstico y sobrevida global.^{5,16} Buscando una táctica que permita una certera selección de pacientes y una solución para evitar los vaciamientos axilares innecesarios, Morton y col. describieron el mapeo linfático para detección y estudio del GC o primer ganglio que recibe el drenaje linfático del área del tumor primario.⁸ El mapeo linfático y biopsia del GC parecen ser actualmente el mejor camino para

establecer el estado de los ganglios linfáticos sin la remoción de la cadena linfática con notables ventajas: ofrece uno o unos pocos ganglios para un estudio más exhaustivo, con adecuada relación costo/beneficio, que sería impracticable en todos los ganglios de un vaciamiento y es un proceso seguro y de bajo costo.²² Diferentes estudios internacionales, nacionales y reuniones de consenso, han validado la técnica de identificación del ganglio centinela en pacientes con cáncer de mama, mostrando un porcentaje de identificación del GC de hasta 98% en manos experimentadas, sin recurrencia axilar en un seguimiento de 39 meses.^{5,15,23-26} Si el GC no es estudiado exhaustivamente existen posibilidades de subdiagnóstico. En nuestro trabajo comprobamos que es un procedimiento que, una vez cumplida la curva de aprendizaje, es efectivo y de bajo costo, logrando la identificación intraoperatoria del GC en todos los casos estudiados en este protocolo. La evaluación del GC varía en los distintos trabajos en un amplio espectro que incluye citología, HE e IHQ.²⁷ Hemos estudiado intraoperatoriamente por citología cada GC con una correlación con los métodos por di-

ferido superior al 95%. Cumplida la curva de aprendizaje de los evaluadores no ha sido necesario el empleo de técnicas adicionales en esta instancia. Posteriormente comparamos los hallazgos obtenidos con cortes seriados del material coloreados con HE e IHQ. Se incrementó en un 25% la detección de metástasis en GC negativos con HE mediante diferentes CK: CAM 5.2 o CK-AE1-AE3.^{19,21,28} La CK-AE1-AE3 es el marcador epitelial más sensible y específico para reconocer células epiteliales neoplásicas en GC, con un menor número de falsos positivos. En nuestro trabajo usamos CK-AE1-AE3 y detectamos 3/16 casos, si hubiésemos evaluado cada GC sólo con HE hubiésemos detectado 2/16 casos. La técnica de RT-PCR multiplex es altamente sensible y específica para la detección de marcadores moleculares, con lo cual el número de metástasis y micrometástasis halladas es superior al diagnosticado con técnicas de rutina (HE y/o IHQ).²⁹ Nuestros resultados de detección con técnicas de biología molecular (6/16) son comparables a los publicados por otros autores.^{12,16,30} El empleo de más de un marcador molecular (MAG-A y B) aumentó la sensibilidad de la técnica, sin poder hasta el momento delinear la implicancia pronóstica que ello conlleva. Cabe destacar que los tres casos que sólo fueron positivos con técnicas moleculares, lo fueron con la isoforma MAG-B. De no haber incluido la misma en el diseño, estas tres pacientes con micrometástasis no hubiesen sido detectadas. Comparando los datos aportados por el estudio histopatológico y molecular del GC con el perfil clínico-quirúrgico de las pacientes, no hemos encontrado diferencias en el perfil de pacientes que expresan alguna y/o ambas isoformas de MAG. Ciertos autores asocian la detección de MAG a un mejor pronóstico por estar relacionada con tumores mejor diferenciados, mientras que otros la asocian a un pronóstico ominoso dado que implica la presencia de células neoplásicas en un ganglio axilar.^{31,32} No hemos podido demostrar diferencias estadísticamente significativas en los

pacientes con GC positivos únicamente por IHQ y/o por PCR, en cuanto a sus características clínicas-histopatológicas o progresión de la enfermedad en el tiempo de seguimiento. Debido a que numerosos artículos publicados han postulado que la recurrencia de la enfermedad se manifiesta luego de 10 años de seguimiento, creemos que estas pacientes deben ser seguidas clínicamente a más largo plazo.³³

CONCLUSIONES

El mapeo linfático y biopsia del GC parecen ser actualmente el mejor camino para establecer la presencia de metástasis en el carcinoma mamario sin necesidad de la remoción de la cadena linfática. El mismo evita vaciamientos axilares innecesarios, reduciendo costos y morbilidad. Dado que la técnica de HE es insuficiente para la identificación de todos los GC que tienen micrometástasis, el agregado de técnicas de IHQ y de BM aumentan en forma significativa la sensibilidad del estudio anatomopatológico. La técnica RT-PCR multiplex desarrollada para MAG-A y B es específica y sensible. Hemos encontrado que los individuos que sólo tenían detección de micrometástasis por BM, expresaban MAG-B exclusivamente. No observamos asociación entre parámetros clínicos y la detección del marcador. Este trabajo es un generador de hipótesis. Se requerirán nuevos estudios con mayor número de pacientes y seguimiento a más largo plazo para confirmar las mismas. Estas técnicas quizás permitan en un futuro cercano modificar la estadificación y tratamiento de las pacientes con cáncer de mama.

REFERENCIAS

1. Ellis IO, Schitt SJ, Sastre-Garau X, et al. World Health Organization of Tumours. Invasive breast carcinoma. Tumours of the breast and female genital organs. Pathology and genetics. IARC Press, Lyon, 2003; pp.13-69.
2. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor

- size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* 1989; 63: 181-187.
3. Fisher ER, Sass R, Fisher B. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Project for Breast Cancers (protocol no. 4). X. Discriminants for tenth year treatment failure. *Cancer* 1984; 53: 712-723.
 4. Reed W, Bohler P, Sandstad B, Nesland J. Occult metastases in axillary lymph nodes as a predictor of survival in node-negative breast carcinoma with long-term follow-up. *Breast J* 2004; 10: 174-180.
 5. Giuliano A, Haigh P, Brennan M, et al. Prospective observational study of sentinel lymphadenectomy without further axillary dissection in patients with sentinel node-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 2000; 18: 2553-2559.
 6. Bostick P, Morton D, Turner R, et al. Prognostic significance of occult metastases detected by sentinel lymphadenectomy and Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction in early-stage melanoma patients. *J Clin Oncol* 1999; 17: 3238-3244.
 7. Shivers S, Wang X, Li W, et al. Molecular staging of malignant melanoma. Correlation with clinical outcome. *JAMA* 1998; 280: 1410-1415.
 8. Morton D, Wen D, Wong J, et al. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg* 1992; 127: 392-399.
 9. Krag D, Weaver D, Ashikaga T, et al. The sentinel node in breast cancer. A multicenter validation study. *NEJM* 1998; 339: 941-946.
 10. Ouellette RJ, Richard D, Maicas E. RT-PCR for mammaglobin genes, MGB1 and MGB2, identifies breast cancer micrometastases in sentinel lymph nodes. *Am J Clin Pathol* 2004; 121: 637-643.
 11. Ouellette RJ, Richard D, Maicas E. RT-PCR for mammaglobin genes, MGB1 and MGB2, identifies breast cancer micrometastases in sentinel lymph nodes. Erratum in: *Am J Clin Pathol* 2004; 122: 813.
 12. Gillanders WE, Mikhitarian K, Hebert R, et al. Molecular detection of micrometastatic breast cancer in histopathology-negative axillary lymph nodes correlates with traditional predictors of prognosis. *Ann Surg* 2004; 239: 828-840.
 13. Timar J, Csuka O, Orosz Z, Jeney A, Koper L. Molecular pathology of tumour metastases. II. molecular staging and differential diagnosis. *Pathol Oncol Res* 2002; 8: 204-219.
 14. Denninghoff V, Kahn A, Falco J, Curutchet H, Elsnor B. Sentinel lymph node. Detection of micrometastases of melanoma in a molecular study. *Mol Diagn* 2004; 8: 253-258.
 15. Liberman L. Pathologic analysis of sentinel lymph nodes in breast carcinoma. *Cancer* 2000; 88: 971-977.
 16. Cummings MC, Walsh MD, Hohn BG, Bennett IC, Wright RG, McGuckin MA. Occult axillary node metastases in breast cancer do matter: results of 10-year survival analysis. *Am J Surg Pathol* 2002; 26: 1286-1295.
 17. Dowlatshahi K, Fan M, Bloom KJ, Spitz DJ, Patel S, Snider HC Jr. Occult metastases in the sentinel lymph nodes of patients with early stage breast carcinoma: a preliminary study. *Cancer* 1999; 86: 990-996.
 18. Tanis P, Boom R, Koops H, et al. Frozen section investigation of sentinel node in malignant melanoma and breast cancer. *Ann Surg Oncol* 2001; 8: 222-226.
 19. Yared M, Middleton L, Smith T, et al. Recommendations for sentinel lymph node processing in breast cancer. *Am J Surg Pathol* 2002; 26: 377-382.
 20. Cserni G, Amendoeira I, Postolikas N, et al. Discrepancies in current practice of pathological evaluation of sentinel lymph node in breast cancer. Results of a questionnaire based survey by the European Working Group for breast screening pathology. *J Clin Pathol* 2004; 57: 695-701.
 21. Blaheta H, Schittek B, Breuninger H, et al. Lymph node micrometastases of cutaneous melanoma: increased sensitivity of molecular diagnosis in comparison to immunohistochemistry. *Int J Cancer* 1998; 79: 318-323.
 22. Boi S, Cristofolini P, Togni R, et al. Detection of nodal micrometastases using immunohistochemistry and PCR in melanoma of the arm and trunk. *Melanoma Res* 2002; 12: 147-153.
 23. Loza J, Coló F, Sporn V y col. La biopsia del ganglio centinela en cáncer de la mama. Resultado de un estudio de 106 pacientes. *Rev Arg Mastol* 2000; 19: 181-197.
 24. Reunión Nacional de Consenso sobre la biopsia del ganglio centinela en cáncer de mama. *Rev Arg Mastol* 2005; 24: 84-92.
 25. Lorusso C, Corrao F, Orti R, Guixá H, Cohen Imach G, Testa R. Ganglio centinela en el cáncer de mama: su detección y correlación anatomopatológica. Experiencia de 8 años en el Servicio de Ginecología del Hospital Italiano de Buenos Aires. *Rev Arg Mastol* 2006; 25: 18-26.
 26. Barbera L. Análisis de la experiencia de cinco centros nacionales: 860 casos de ganglio centinela en cáncer de mama. *Rev Arg Mastol* 2003; 22: 9-23.
 27. Freneaux P, Nos C, Vincent-Salomon A, et al. Histological detection of minimal metastatic involvement in axillary sentinel nodes: a rational basis for sensitive methodology usable in daily practice. *Mod Pathol* 2002; 15: 641-646.
 28. Watson M, Dintzis S, Darrow C, et al. Mammaglobin expression in primary, metastatic, and occult breast cancer. *Cancer Res* 1999; 59: 3028-3031.
 29. Benoy I, Elst H, Van Der Auwera I, et al. Real-time

RT-PCR correlates with immunocytochemistry for detection of disseminated epithelial cells in bone marrow aspirates of patients with breast cancer. *J Cancer* 2004; 91: 1813-1820.

30. Cerveira N, Torres L, Rocha P, et al. Highly sensitive detection of the MGB1 transcript (mammaglobin) in the peripheral blood of breast cancer patients. *Int J Cancer* 2004; 108: 592-595.
31. Zach O, Kasparu H, Krieger O, Hehenwarter W, Girschikofsky M, Lutz D. Detection of circulating mammary carcinoma cells in the peripheral blood of breast cancer patients via a nested reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for mammaglobin mRNA. *J Clin Oncol* 1999; 17: 2015-2019.
32. OoKa M, Tamaki Y, Sakita I, et al. Bone marrow micrometastases detected by RT-PCR for mammaglobin can be an alternative prognostic factor of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2001; 67: 169-175.
33. Treseler P. Pathologic examination of the sentinel lymph node: what is the best method?. *The Breast J* 2006; 12: S143-S151.

DEBATE

Dr. Lorusso: Ustedes estudiaron a las pacientes con mamoglobina positiva, ¿qué tipo de metástasis tenían en el ganglio centinela, si eran submicrometástasis, ITC o macrometástasis?, ésa es una de las preguntas. Otra es, si leí bien en el trabajo que presentó, ¿en el estudio intraoperatorio del centinela hacen cortes cada 2 mm para la impronta?

Dr. Ábalo: Eso depende del tamaño del ganglio; cuando el ganglio es grande se puede, cuando es chico se hace un corte central y se hace una impronta de las dos caras solamente. Cuando el ganglio es grande se pueden hacer varios cortes; no sé sí cada 2 mm, pero varios cortes para la impronta de varias caras del ganglio.

Dr. Lorusso: Tal vez el Dr. Elsner lo sabe, si no comienzan el estudio de la impronta por el seno, por donde entra el canalículo aferente, que es donde habitualmente se encuentran las submicrometástasis o las micrometástasis.

Dr. Ábalo: Si el señor Presidente me permite yo quisiera trasladar la pregunta al Dr. Elsner, porque este es un tema de anatomía pato-

lógica y él va a contestar mejor que yo.

Dr. Elsner: Comenzamos con el ganglio centinela en melanoma maligno y después lo trasladamos a mamas unos años después. En realidad lo que hacemos como parámetro es, como dijo bien el Dr. Ábalo, rescatar una lonja central para biología molecular. Ahora en esa lonja central se realiza la impronta en ambos costados por un lado, ahí se sacan dos improntas; y se sacan otras dos improntas de las hemisferas que quedan de la parte periférica. Así que ya se queda con cuatro improntas por ganglio centinela, que se miran unas tras otra, coloreadas con azul de toluidina o lo que el patólogo prefiera. Esa es una pregunta, no me acuerdo cuál era la otra.

Dr. Lorusso: Una vez que encontraban mamoglobina positiva por inmunohistoquímica, ¿qué tipo de metástasis les ofreció?

Dr. Elsner: Había tres casos en los que no había nada en la microscopía y había uno que tenía una micrometástasis, que se detectó por inmunohistoquímica. Había dos que tenían metástasis habituales, que fueron las clasificadas con hematoxilina común.

Dr. Lorusso: Mayores de 2 mm.

Dr. Elsner: Claro. Pero lo interesante de esto, es que para el patólogo es un poco frustrante. Para el que está acostumbrado a ver preparados y ver células tumorales, que el biólogo molecular le dice, acá es mamoglobina positivo o tiene oxinasa positivo, o lo que sea positivo, y usted hace el corte, hace la inmuno y nada.

Dr. Dávalos: Primero me parece interesante la línea de investigación. Ya se han hecho publicaciones sobre las micrometástasis por polimerasa o por inmunohistoquímica y no se han encontrado como variables independientes. Creo haberle escuchado que usted dijo que no encontraron relación con otros factores de pronóstico. Los trabajos publicados que yo he visto están encontrando una correlación de presencia de inmunohistoquímica con factores negativos de pronóstico. El valor de esta metástasis con

inmunohistoquímica o polimerasa se verá en el protocolo que está haciendo el Colegio Americano de Oncólogos Cirujanos. Yo le quería preguntar y sobre todo al patólogo, si estas técnicas de inmunohistoquímica o polimerasa detectan células cancerosas o células epiteliales.

Dr. Elsner: Estas técnicas, hablamos de inmunohistoquímica primero, detectan obviamente células epiteliales. En mama se usa una citoqueratina que generalmente es de bajo peso molecular. Del cóctel hay uno de tres; lo que se usa es la de tres básicamente, lo que reacciona más, y detecta células epiteliales; ojalá tuviéramos marcadores que detectasen células cancerosas. Con biología molecular pasa exactamente lo mismo. No hay un marcador. Yo creo que los patólogos y todos estarían muy contentos si hubiera un marcador de células cancerosas, pero no lo hay. Existe toda una gama de factores de proliferación, etc., pero no tiene nada que ver con el hecho de que una célula sea neoplásica o no.

Dr. Gori: A mí el trabajo me pareció muy interesante, muy lindo y especialmente porque están empezando a hacer algo; es algo que es bueno. Hay más preguntas que respuestas, como todo lo que se comienza a hacer, son muchas hipótesis. Pero hay un punto de la metodología que tal vez sería muy interesante reevaluar para que todo el esfuerzo después no tenga un sesgo en los resultados. Ustedes estudian con hematoxilina eosina muchos cortes, y utilizan uno solo para los estudios de investigación; es decir, no son homogéneas las muestras del patrón *versus* el elemento a investigar. Entonces, yo creo que por razones de costos, por razones de lo que sea, pero evidentemente es un esfuerzo sumamente interesante, pero presentaría un sesgo dado que son dos elementos diferentes analizados. ¿Cómo podrían solucionar eso y si realmente lo han tenido en cuenta?

Dr. Ábalo: Lo hemos tenido en cuenta y tanto, que justamente lo hablé con el Dr. Elsner, a quien le voy a dar ahora la palabra. Yo le

pregunté también esto que usted dice. Nosotros preservamos una franja central del ganglio pero, qué pasa si la metástasis la tiene subcapsular en la otra punta. El Dr. Elsner me dio una respuesta que ahora le pido que se las dé también a ustedes.

Dr. Elsner: Creo que acá hay un poco de confusión terminológica ya que lo que se preserva para biología molecular no es un corte, es una lonja de tejido. Es una lonja de tejido que podrá tener un 1 mm de espesor, pero es mucho más gruesa que un corte histológico. Nadie realmente sabe si ahí están las células tumorales o no, es una cuestión de azar; pero alguna técnica había que usar. Al mismo tiempo teníamos la responsabilidad asistencial en el momento de la biopsia intraoperatoria de decirle al ginecólogo o al mastólogo, acá hay células tumorales o no. Para eso es obvio que, si usted hace cuatro improntas le va a salir un índice positivo mayor que si hace una. Esas cifras que mencionó el Dr. Ábalo a mí me parece que en manos nuestras es mucho más baja. Hay de vez en cuando falsos negativos. Desgraciadamente, no se hizo en ese estudio, ni se puede seguir haciendo con esto. Mucho de esto es anotar cuáles son los falsos negativos o positivos, pero es mucho menos del 25%.

Dr. Ábalo: Esas no son cifras nuestras, son del estudio que tiene más de 5.000 pacientes evaluadas con ganglio centinela.

Dr. Elsner: Perdón, sí ya sé, pero yo no creo que en ese momento en manos de patólogos entrenados en observar metástasis y carcinomas de mamas, la inmunohistoquímica le agregue un 25%; le va a agregar mucho menos. Prueba que en la segunda serie que tiene el Dr. Ábalo de más pacientes, la inmuno no le agregó nada. La inmuno a lo sumo podrá agregar un 10% y probablemente en metástasis subcapsulares de lobulillares de bajo grado. Porque las metástasis de las ductales, si tiene una buena técnica, las ve. Hay que tener en cuenta que acá no se hacen cortes seriados del ganglio, se ha-

cen cortes de las dos mitades, se hacen cortes en la parte media, pero eso no es el estudio, como el famoso estudio Ludwig de hace muchos años que derivaron todos los ganglios a un centro en Alemania e hicieron cortes seriados y terminaron con un 10% más de metástasis. Es decir, cuantos más cortes se haga y más estudie, más metástasis va a tener, esto es obvio. Pero acá cortes seriados de ganglios no se hace justamente por motivo de costos. Porque es muchísimo más costoso, desde el punto de vista metodológico, sobre todo en tiempo del patólogo, tener una bandeja de cortes seriados de ganglios linfáticos, de melanoma, metástasis, mama, cáncer gástrico, lo que sea, que hacer este tipo de tecnología.

Dr. Ábalo: Respecto a la diferencia entre hematoxilina eosina y biología molecular, es que la hematoxilina eosina es operador dependiente; o sea, depende de una técnica y depende de un patólogo que lo mira y lo lea. Lo otro es una técnica que dice que es positivo o negativo. Es una técnica de laboratorio que da un resultado, positivo o negativo; elimina el factor humano.

Dr. Núñez De Pierro: Simplemente un comentario para el contexto. Recuerden que cuando hablamos de lo que estamos agregando o desagregando, está claro cuánto, pero no sabemos qué. No tenemos la más mínima idea de lo que estamos agregando o desagregando.

Dr. Lorusso: Ahí iba mi comentario. Todo el estudio del centinela está sesgado desde su comienzo, ¿por qué? El Dr. Elsner lo mencionó, los costos de hacer la mamoglobina, todo el ganglio debe ser muy superior y tal vez impracticable, punto número uno. El punto número dos, es que ya partimos de la base, como decía el Dr. Núñez De Pierro, que esto no se sabe si se está sobreestadificando, porque pueden ser células epiteliales benignas que migraron por una punción, no se sabe. Es raro que una mamoglobina detecte una macrometástasis y que el patólogo no la pudo advertir. El sesgo del ganglio centinela ya es desde su inicio; es decir, el ganglio centinela se comenzó a comparar, a cote-

jar y a conocer su predictibilidad en lo que es la predicción, valga la redundancia, del resto de los ganglios de la axila sobre la base de un estudio exhaustivo del mismo y a un estudio convencional del resto de los ganglios de la axila. O sea, que ya partimos de la base de que en la práctica en el estudio centinela ya hay un sesgo que es inevitable. Y como usted bien dijo, este es un trabajo, es una línea de investigación, es algo que obviamente no determina conductas y que tampoco cambia el estadio, porque como bien la clasificación lo dice, sigue siendo un PNO aunque sea mamaglobina positivo.

Dr. Billinghamurst: Un poco lo adelantó el Dr. Lorusso, sigue siendo un N0, ¿pero ustedes en el trabajo tuvieron o piensan tener en el futuro algún cambio de conducta por estos hallazgos? Que es la duda que existe, si vale la pena o no hacer algo después.

Dr. Ábalo: Por ahora no. Estamos dando los primeros pasos en un trabajo y estamos viendo qué es lo que tenemos; el tiempo dirá. Nos falta tiempo y seguimiento. Número de pacientes y tiempo de seguimiento; puede que esto sirva o no. Puede ser que dentro de 5 años no lo hagamos más o que esto sea la técnica habitual de estudio de un ganglio; son los primeros pasos. De cualquier forma creo personalmente que todo lo que lleva a mejorar la sensibilidad de un método, puede llegar a tener algún éxito futuro, y creo que lo va a tener. También hablábamos de todas estas controversias cuando se empezó a hacer ganglio centinela y decíamos, ¿esto servirá o no servirá? Hoy en día es una técnica habitual.

Dr. Núñez De Pierro: Mire la centellografía ósea comparada con la radiología. Ciertas veces un aumento de sensibilidad indiscriminado conspira tanto contra la especificidad que se pierde el horizonte.

Dr. Ábalo: Pero esto tiene especificidad, aparentemente.

Dr. Núñez De Pierro: Para epitelial.

Dr. Ábalo: Sí.

Dr. Billinghamurst: Entonces, usted cree que va a tener que hacer vaciamiento axilar cuando esto se confirme que es desfavorable.

Dr. Ábalo: No, no sé.

Dr. Billinghamurst: ¿Las pacientes lo saben?

Dr. Ábalo: Sí, nosotros tenemos un consentimiento informado con las pacientes de que se hace esta técnica, pero como técnica de investigación y nada más. Yo no creo que tengamos que hacer una linfadenectomía, yo tengo las mismas dudas que ustedes, yo no sé si esto va o no a servir, tengo algún *feeling* personal que puede servir, nada más. Puedo equivocarme, lógico.

Dr. Gori: Con todo lo que se está diciendo acá, no creo que el trabajo haya querido demostrar nada de las preguntas que le han hecho. Nadie va a tomar una conducta por un ensayo de investigación. Nadie puede saber qué es lo que estamos midiendo y nadie puede saber cuál puede ser el resultado final de ello. Es por eso que en la investigación es trascendente evitar los sesgos. Si el costo es alto, la investigación tiene resultados malos, si no se realizan. Si el patrón es medido de una manera, en cualquier trabajo de investigación, la comparación tiene que ser medida exactamente de igual manera. Si no el sesgo es muy grande y todo el esfuerzo no va a llegar a ninguna conclusión. Por eso le decía que el estudio tiene que ser de la misma cosa y no de algo parecido, si no vamos a confundir lo verdadero con lo verosímil. En investigación no se puede aceptar.

Dr. Ábalo: Le agradezco los comentarios y los vamos a tener en cuenta con los investigadores jóvenes para ver en qué forma podemos disminuir el sesgo.

Dr. Elsner: Se habló bastante de costos y realmente es mucho más barato hacer una inmunohistoquímica y mamaglobina en un ganglio centinela, que hacer un corte seriado en todo el ganglio. Tanto en insumos como en tiempo de patólogo básicamente. Así que, si hablamos de costos, si nos contentamos con que los

consensos de mama sugieren que hay que partir el ganglio por la mitad y sacar un corte de cada mitad, bueno eso está bien. Ahora, si algún protocolo quiere hacer cortes seriados, de ganglios linfáticos hacer 40 ó 50 cortes de cada ganglio, eso es mucho más caro, que lo que expuso el Dr. Ábalo. Mucho más caro. Especialmente en tiempo del patólogo, que es el tiempo más caro de todos.

Dr. Núñez De Pierro: Creo interpretar que lo que el Dr. Gori decía a propósito de los costos, es justamente que debía haberse abordado el estudio histológico, por más que representara altísimos costos, con la misma minuciosidad que el estudio inmunohistoquímico. Es decir, no es que sea más cara la inmunohistoquímica, no quiero ser el exégeta del Dr. Gori, pero me pareció entender eso.

Dr. Elsner: El que propuso la idea del ganglio centinela, que es el Dr. Morton de Santa Mónica, en melanoma, justamente se basó en eso; que era mucho más barato hacer una detección de tiroxinas en un ganglio centinela e inmunohistoquímica, en comparación a que el patólogo le haga cortes seriados de todo el vaciamiento axilar o de todo ese ganglio centinela, para mirarlo.

Dr. Núñez De Pierro: Estoy de acuerdo.

Dr. Elsner: El costo es a la inversa de lo que uno puede pensar.

Dr. Núñez De Pierro: Si uno parte de una premisa, de un axioma, nunca sabe si al final era cierto. Que es más barato, es más barato.

Dr. Elsner: Con lo otro, ya más o menos en mamas sabemos. Hay un estudio de la década del 70 u 80, que yo mencioné y se llamó el estudio de Ludwig, que se hizo en Berlín. Ahí hay institutos de patología muy avanzados, que no están en los hospitales. Ellos decían, manden sus ganglios axilares, vaciamientos axilares, a nuestro lugar central y nosotros le vamos a hacer cortes seriados de todo esto. Terminaron con un 10% más de posibles metástasis.

Dr. Gori: La idea no es preguntar cuánto

cuesta. Si al patrón, el primer estudio de ganglios, le hicieron tres cortes, con inmunohistoquímica se tiene que estudiar esos tres cortes. Si le hicieron uno, se tiene que estudiar con uno. Es decir, no pueden estudiar de una manera el patrón y el caso a investigar de distinta manera. No sé si me explico. Si lo parten por la mitad, nada más que uno, y le hacen una sola impronta, eso es lo que se tiene que estudiar en inmunohistoquímica y el resultado va a ser mejor que si a uno lo estudian de una manera y al otro de otra manera. El sesgo está en la diferencia de estudios, no el costo de cómo se mide.

Dr. Ábalo: Yo no sé si técnicamente esto es posible. Es decir, no sé si se puede hacer a la mitad del ganglio, incluirlo todo para biología molecular, no sé. Supongo que la parte que va

para inmunohistoquímica va para inmunohistoquímica y la que va para la otra técnica, va para la otra técnica. Probablemente no se pueda porque lo que se usa para biología molecular es material en fresco y lo demás se va a parafina y es lo que va a inmunohistoquímica, para hematoxilina eosina; entonces, no creo que se puedan aplicar las mismas técnicas al mismo material.

Dr. Lorusso: Como decía, el centinela ya salió sesgado y se aceptó. Todo no debe ser así. Es correcto lo que usted está planteando metodológicamente, pero el centinela ya salió sesgado por lo que acabamos de comentar, y se aceptó como procedimiento definitivo. Imagínese que le hiciera mamoglobina a los 21 ganglios que saca, creo que va a encontrar 200% de mamoglobina positiva.