

DETECCIÓN DE MICROMETÁSTASIS DE CÁNCER DE MAMA EN GANGLIO CENTINELA POR BIOLOGÍA MOLECULAR

Valeria Denninghoff,* Fernando Paesani,** Florencia Perrazo,*** Alejandro García,*
Alejandra Avagnina,* Eduardo Ábalo,** Gabriel Crimi,** Boris Elsner *

RESUMEN

El estudio del ganglio centinela (GC) en cáncer de mama, es una evaluación confiable del estatus axilar. El motivo del presente estudio es evaluar mediante técnicas de biología molecular (BM), la presencia del RNA mensajero de mamaglobina (MAG) A y B, en GC de mama y correlacionar estos hallazgos con las características del tumor mamario, intentando identificar un subgrupo de individuos con mayor riesgo de tener metástasis en ganglios axilares.

Fueron estudiadas prospectivamente (junio 2004-agosto 2007) 43 pacientes con cáncer de mama (tumor menor de 3 cm y axila clínicamente negativa). Se realizó citología intraoperatoria, seleccionándose casos con GC negativo, para estudio con hematoxilina-eosina (HE), inmunohistoquímica (IHQ) y BM. Se realizó seguimiento clínico.

Con técnicas de rutina se observaron micrometástasis en 3 casos, con IHQ 5 casos (2 de ellos negativos con HE) y con BM 21 casos GC positivo.

En conclusión, el agregado de la IHQ y más aún de la BM, aumenta la sensibilidad para la detección de micrometástasis en el GC. No hallamos una relación directa entre los factores de riesgo analizados en los individuos y la expresión de MAG. Podría plantearse la posibilidad de que MAG sea un marcador de pronóstico independiente de los factores de riesgo evaluados.

Palabras clave

Mamaglobina. Micrometástasis. Ganglio centinela. Cáncer de mama. PCR.

SUMMARY

The prognosis of breast cancer patients depends on primary tumor resection and axillary lymph nodes examination. The purpose of this study was to evaluate by molecular biology (MB) techniques the presence of mammaglobin (MAG) A and B messenger RNA in breast sentinel lymph node (SLN), and to make a correlation with tumor characteristics in order to identify a subgroup of patients at a high risk of metastasis in the SLN.

* Servicio de Patología.

** Departamento de Ginecología y Obstetricia.

*** Servicio de Oncología Clínica.

Centro de Educación Médica e Investigación Clínica (CEMIC), Buenos Aires, Argentina.
Correo electrónico para la Dra. Valeria Denninghoff: vdenninghoff@cemic.edu.ar

Between June 2004 and August 2007, 43 patients with breast cancer (tumor less than 3 cm and clinically negative axilla) were prospectively studied. Intraoperative cytology was performed in patients with negative SLN, for hematoxylin-eosin (HE), immunohistochemistry (IHC) and MB techniques. Clinical follow-up was also included. Metastases were detected with routine techniques in 3 cases, with IHC in 5 cases (2 of them were negative for HE), and with MB in 21 cases positive SLN.

In conclusion, the inclusion of HE and MB allows a higher sensitivity in the micrometastasis detection in SLN. We found no direct correlation between the risk factors analyzed and MAG expression. MAG would be a prognostic marker different from the other evaluated risks.

Key words

Mammaglobin. Micrometastasis. Sentinel lymph node. Breast cancer. PCR.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es el primer tumor en frecuencia a nivel mundial en mujeres y representa el 22 % de todas las neoplasias femeninas.¹ Un alto porcentaje de las mujeres es menor de 40 años. El compromiso de ganglios axilares está íntimamente relacionado con la sobrevida y recurrencia de la enfermedad, y tiene implicancias en el tratamiento adyuvante.²⁻⁴ Inicialmente se realizaba una linfadenectomía axilar profiláctica en todas las pacientes, conjuntamente con la cirugía mamaria. Esta técnica presenta diversas complicaciones posquirúrgicas, como el linfedema crónico, que se puede observar hasta en un 37% de los casos. 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 que aumenta con el tiempo y tamaño tumoral. Las células tienden a penetrar el sistema linfático a 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 no sólo determina

el estadio, sino que es útil para la elección de la terapia adyuvante y para los procedimientos de seguimiento.⁶ Basándose en esta última premisa, se estableció que el conocimiento del estado de los ganglios linfáticos regionales en pacientes con tumores sólidos, como uno de los factores de pronóstico más relevantes.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 cols.⁸ desarrollaron en 1992 un método denominado linfadenectomía selectiva (LS), que consiste en la identificación del primer ganglio que recibe drenaje linfático del área del tumor y que fue llamado ganglio centinela (GC). Su identificación permite el estudio minucioso de metástasis subclínicas en el examen anatomopatológico. De esta manera se pueden seleccionar los casos que se beneficiarán con el tratamiento quirúrgico. Es posible determinar la presencia de metástasis en el ganglio axilar en pacientes con cáncer de mama, con técnicas histopatológicas convencionales en la mayoría de los casos, pero creemos que en un porcentaje variable podemos subdiagnosticar a los individuos debido a limitaciones propias de las técnicas. Al no identificar estas metástasis, las pacientes son subtratadas, porque el estatus ganglionar negativo no permite la utilización de tratamientos más agresivos, como linfadenectomías o tratamientos

quimioterápicos. En la actualidad somos capaces de determinar metástasis, micrometástasis (entre 0,2 y 2,0 mm) y submicrometástasis, células neoplásicas aisladas o pequeños grupos < 0,2 mm. En la estadificación *Tumor-Node-Metastasis* (TNM) del American Joint Committee on Cancer, se han definido subgrupos dentro del pN0 (estadificación ganglionar de patología negativa con hematoxilina-eosina [HE]) de ganglios según la técnica utilizada para la evaluación de los mismos (Tabla I).¹ El hecho de que estas categorías hayan sido incluidas en la última estadificación, impulsa el empleo de nuevas técnicas, más sensibles que las anteriores, en la búsqueda de células tumorales en el GC de mama.⁹ Métodos de biología molecular (BM) permiten una evaluación más exhaustiva del ganglio. La evaluación de marcadores moleculares en el/los ganglio/s permite identificar ganglios positivos con una mayor sensibilidad.

En la actualidad, este hallazgo no determina cambios terapéuticos, pero la correlación de estos resultados con las características clínicas y la sobrevida de las pacientes permitirán conocer si tienen significado clínico. Si esto ocurriese, en un futuro, este grupo con enfermedad temprana podría beneficiarse con tratamientos más personalizados de acuerdo a las características y agresividad de su tumor y/o estatus ganglionar, por lo cual mejoraríamos las posibilidades de aumentar la sobrevida a largo plazo.

La expresión de la información genética almacenada es un proceso complejo. Se basa en el "Dogma de la Biología Molecular" que representa el progreso de la información desde el ácido desoxirribonucleico (DNA) hacia el ácido ribonucleico (RNA) y de éste a su vez, a proteínas.¹⁰ La posibilidad de amplificar a voluntad un RNA específico abre perspectivas ilimitadas.¹¹ La PCR demostró ser la técnica más sensible para detectar la mínima cantidad de células tumorales comparada con otros métodos. La RT utilizada conjuntamente con la PCR para la determinación de metástasis en GC de mama, abren

Clasificación	Técnica adicional	Estadificación TNM
pN0	Ninguna	pN0
	IHQ	pN0 (i -) pN0 (i +)
	BM	pN0 (mol -) pN0 (mol +)
<p>pN0: Estadificación ganglionar de patología negativa con hematoxilina-eosina. IHQ: Inmunohistoquímica. BM: Biología molecular. (i): IHQ. (mol): BM. (+): Positivo. (-): Negativo.</p>		

Tabla I. Estadificación de patología 2002 del *Tumor-Node-Metastasis* (TNM) del American Joint Committee on Cancer.

un nuevo horizonte de posibilidades en el estudio, diagnóstico y tratamiento de estos casos, así como también plantean diversos interrogantes con relación a su implicancia pronóstica, que esperamos responder en un futuro cercano. 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

Grandes estudios han mostrado desventajas en la sobrevida de pacientes con micrometástasis en ganglios axilares.^{13,14} El Consenso Internacional de Expertos reunidos en Saint Gallen en el año 2005, separó a los casos en tres categorías de riesgo, para definir el esquema terapéutico adyuvante, según su estado ganglionar asociado con otras variables como la edad, el tamaño tumoral, la presencia de invasión linfvascular, el grado histológico y la expresión de HER-2/neu. El significado pronóstico de determinar la presencia de colgajos celulares y células neoplásicas aisladas continúa aún sin consenso.¹⁵ Actualmente se considera a los casos con micrometástasis o presencia de células aisladas, como axila negativa para la clasificación.¹⁶ Identificar a este último grupo, en el cual las técnicas convencionales histopatológicas no detectan metástasis que podrían observarse mediante

BM, podría beneficiarlo con tratamientos adyuvantes adecuados, con posibilidades de aumentar la sobrevida a largo plazo.

El motivo del presente estudio, es evaluar mediante técnicas de BM la presencia del RNA mensajero de MAG-A y B, en GC de mama y correlacionar estos hallazgos con las características del tumor mamario, intentando identificar un subgrupo con mayor riesgo de tener metástasis en ganglios axilares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Entre junio de 2004 y agosto de 2007, fueron estudiados en forma prospectiva, los GC de 43 mujeres, con diagnóstico de cáncer de mama. Se incluyeron los tumores mamarios menores o iguales a 3 cm, sin adenopatías axilares palpables y con resultado negativo del estudio intraoperatorio del GC. Se realizó linfocentellografía preoperatoria (LCP), inyectando en forma intradérmica LINFO-TEC (99mTc)-Dextrano 70.000 (TECNONUCLEAR, Sociedad Anónima, Bs Aires, Argentina), en la región del complejo areola-pezones. Con cámara gama se identificaron el o los territorios ganglionares de drenaje, y dentro de éstos, el primer o primeros ganglios en captar (GC). Durante el acto operatorio se inyectó con una aguja 25 gauge, 3 a 5 ml de azul patente al 1% en forma intradérmica, en la región del complejo areola-pezones, realizando a continuación un masaje suave para movilizar el colorante en los linfáticos. Luego de un tiempo variable de espera que puede oscilar entre 5 y 20 minutos, se realizó una pequeña incisión sobre el área ganglionar marcada preoperatoriamente. El diseño de la misma debe ser tal que permita ser ampliada en caso de necesitarse un vaciamiento ganglionar axilar. Se identificó el conducto linfático teñido de color azul verdoso, éste se siguió cuidadosamente hasta el primer ganglio coloreado, que es el centinela. Este método se combina con la linfocentellografía intra-

operatoria mediante un contador nuclear manual DGC-II Gamma Probe (NuclearLab S.R.L., Argentina). A continuación se exploran varios centímetros alrededor de éste en busca de ganglios adicionales teñidos y/o emisores de radioactividad. Inmediatamente se extrae el GC para realizar el estudio anatomopatológico. Se extirpa el tumor primario con márgenes adecuados. El procedimiento se realiza con anestesia general. Los GC resecados se estudian intraoperatoriamente donde se hemiseccionan, en caso de ser pequeños, o se obtienen lonjas finas de aproximadamente 2 mm en los ganglios mayores. Se realizó la impronta de las superficies de corte resultantes y se colorearon con azul de toluidina. La evaluación se realizó mediante estudio citológico.¹⁷ Sólo los GC negativos en la evaluación intraoperatoria fueron incorporados en el estudio. Se crioconservó el 20% del GC (si el GC es mayor a 0,5 cm) en nitrógeno líquido (a -196° centígrados) para el estudio de BM y el resto del GC se fijó en formol *buffer* al 10% y se incluyó en parafina. Del taco de parafina se realizaron cortes seriados de 3 micrones para HE e IHQ, con la utilización de anticuerpos monoclonales anticitoqueratina (CK) clon AE1 y AE3 (DAKO, dilución 1:100).^{18,19} Los cortes fueron incubados con el antisuero 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 usaron los controles positivos y negativos correspondientes.

El RNA total celular (RNAt) fue extraído de los fragmentos de tejido en fresco de GC utilizando SV Total RNA Isolation system (Promega Corporation, Madison, WI, EE.UU.). La pureza y calidad del RNAt fue medida por espectrofotometría, y 2 microgramos del RNAt se usaron en la RT. El cDNA de MAG-A y B se amplificó en el mismo tubo de reacción (PCR múltiple) usando *primers* específicos.²⁰ Para la puesta a punto de esta reacción se utilizaron como con-

troles positivos un adenocarcinoma de mama y tres GC con metástasis identificadas con técnicas de rutina, y como controles negativos dos GC con metástasis de melanoma maligno cutáneo. La integridad del RNAm se verificó mediante la amplificación de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPD).²⁰ Como GAPD es una enzima clave en la glucólisis, su RNAm se expresa en todas las células, lo que la hace un control de purificación de este ácido ribonucleico e indica la presencia de RNA viable para la amplificación. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 9%, seguido de la tinción con bromuro de etidio, y luego fueron fotografiados. Se empleó como referencia de tamaño un marcador de peso molecular de 100 pb (Promega Corporation, Madison, WI, EE.UU.). La presencia de bandas de 331/245 pb para RNAm de MAG-A/B humana, respectivamente, se consideró como resultado positivo. Se secuenciaron los fragmentos de las MAG-A y B amplificados por la técnica RT-PCR, para verificar si el producto obtenido es el RNAm de ambas MAG. El secuenciado se realizó con un kit comercial DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, England). La secuencia fue separada por electroforesis capilar (ABI PRISMTM 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystem-Perkin Elmer Corporation, Foster City, CA, EE.UU.). La secuencia obtenida fue analizada con el ABI PRISM[®] DNA Sequencing Analysis Software (Applied Biosystem-Perkin Elmer Corporation, Foster City, CA, EE.UU.).

Se obtuvieron los datos clínico-quirúrgicos: edad al diagnóstico, edad de menarca, estado hormonal (pre- o posmenopáusica), historia familiar, antecedentes familiares y personales, embarazos y partos, cáncer de mama contralateral, tiempo de seguimiento, tipo y grado histológico del tumor, tamaño tumoral, márgenes quirúrgicos, receptores hormonales, *score* del HER-2/neu, invasión vascular y clasificación de riesgo

bajo, intermedio y alto, según el consenso de Saint Gallen.

RESULTADOS

El estudio diferido con las técnicas de rutina mostró la presencia de micrometástasis subcapsulares en 3 casos. Se detectaron 5 casos con IHQ, incluyendo los 3 GC ya mencionados, donde se observaron escasas células neoplásicas aisladas o en pequeños grupos, ubicadas a nivel del seno subcapsular o entremezcladas en el tejido linfóide nodal. Las células tumorales encontradas en la región subcapsular o en el parénquima linfático fueron positivas para CK-AE1-AE3 en todos los casos mencionados. Mediante BM se detectaron 21/43 GC positivos, que incluían los 5 casos anteriormente mencionados (Tabla II).

Las demás formaciones ganglionares estudiadas (22/43) no mostraron metástasis con ninguno de los métodos implementados para el estudio. En todas las muestra se obtuvo material amplificable, el cual fue verificado mediante la reacción de RT-PCR del GAPD. Todos los controles dieron los resultados esperados. La secuencia de los productos de la RT-PCR con los *primers* MAG-A concordó con NCBI Reference Sequences: NM002411, y con los *primers* MAG-B concordó con NCBI Reference Sequences: AF071219.

La mediana de seguimiento de las pacientes seleccionadas fue de 14 meses, con un rango entre 3 y 41 meses. La mediana de edad fue de 61 años, con un rango entre 36 y 83 años. La mediana del tamaño tumoral fue de 1 cm, con un rango entre 0,01 y 3,00 cm. No existieron diferencias significativas entre los casos con GC HE-IHQ-BM positivos y negativos con respecto a la edad al diagnóstico, edad de menarca, estado hormonal (pre- o posmenopáusica), historia familiar, antecedentes familiares y personales, embarazos y partos, cáncer de mama contralateral, tiempo de seguimiento, tipo y grado his-

HE	IHQ	BM	Número de individuos
+	+	+	3 (2AB, 1A) *
-	+	+	2 (1A, 1B) **
-	-	+	16 (4AB, 1A, 11B)
-	-	-	22

HE: Hematoxilina-eosina.
 IHQ: Inmunohistoquímica.
 BM: Biología molecular.
 (+): Positivo. (-): Negativo.
 *: Un individuo HE(+) IHQ(+) BM(-).
 **: Un individuo HE(-) IHQ(+) BM(-).

Tabla II. Resultados de los 43 casos reclutados.

tológico del tumor, tamaño tumoral, márgenes quirúrgicos, receptores hormonales, score del HER-2/neu, invasión vascular, y clasificación de riesgo bajo, intermedio y alto, según el consenso de Saint Gallen (Tabla III). Encontramos mayor frecuencia de cáncer de la mama izquierda en ambos grupos, coincidiendo con la literatura.

Se calcularon los indicadores estadísticos para las técnicas utilizadas. Para la IHQ con relación a la HE fueron: sensibilidad (Sens) 1; especificidad (Esp) 0,95; valor de predicción positivo (VPP) 0,60; valor de predicción negativo (VPN) 1; *likelihoodratio* (LRP) 20, que determina el incremento en la chance de detectar un caso con IHQ. Para BM con respecto a IHQ fueron: Sens 0,76; Esp 0,58; TFP 0,24; TFN 1; y LRP 2,38. Del análisis de las variables estudiadas se desprenden que 21/43 individuos (49%) presentaron alguna de las técnicas utilizadas positiva; de las cuales 3 fueron positivas para MAG-A, 12 para MAG-B y 6 para ambas isoformas. El análisis según el Consenso Internacional de Expertos en Saint Gallen, determinó que 17/21 (81%) pertenecían al grupo de riesgo intermedio y 4/21 (19%) al grupo de bajo riesgo. Si evaluásemos los casos triple negativo (HE-IHQ-BM), 15/22 (68%) pertenecían al grupo de riesgo intermedio y 7/22 (32%) al grupo de bajo riesgo. Del seguimiento del total de reclutados se desprende que dos casos presentaron recidiva

local/regional, uno fue HE (+), IHQ(+), MAG-A(+) y MAG-B(+) y recayó a los 23 meses del seguimiento clínico. El otro fue triple negativo con una recaída a los 21 meses. Ninguno de los tumores con micrometástasis detectados por BM presentaba invasión linfovascular.

CONCLUSIONES

Este es el primer estudio del ganglio centinela mediante técnicas histológicas de rutina (HE e IHQ) y moleculares, en una población de la Argentina con cáncer de mama. La técnica RT-PCR múltiple desarrollada para MAG-A y B es específica y sensible. Comparando los datos aportados por el estudio histopatológico y molecular del GC con el perfil clínico-quirúrgico de los casos no hemos encontrado diferencias en el perfil de individuos que expresan alguna y/o ambas isoformas de MAG. No hemos podido demostrar diferencias estadísticamente significativas en los casos con GC positivo únicamente por IHQ y/o por PCR, en cuanto a sus características clínico-histopatológicas o progresión de la enfermedad en el tiempo de seguimiento. Por lo tanto, se podría plantear la posibilidad de que MAG sea un marcador de pronóstico independiente a los factores de riesgo evaluados. En esta nueva serie y con este seguimiento, estaríamos demostrando el impacto epidemiológico del estudio incompleto de un GC en pacientes con cáncer de mama. Si un GC se estudia sólo con HE, el 18/21 (86%) estarían subdiagnosticados. En cambio si el GC se estudia con HE e IHQ el porcentaje de subdiagnosticados desciende al 16/21 (76%). Estudiando el GC con HE, IHQ y técnicas moleculares, se optimiza la estadificación de tumores sólidos con patrón de diseminación ganglionar y eventualmente, se direcciona el tratamiento para que sean operados solamente pacientes con metástasis ganglionares comprobadas y para que se evite realizar linfadenectomía en las que no tienen metástasis gan-

Biología molecular	Positivo	Negativo
Número	21	22
Isoformas MAG	6-AB, 3-A, 12-B	
Mediana de edad en años (rango)	59 (36-76)	61 (41-83)
Mediana de edad de menopausia en años (rango)	50 (36-54)	51 (36-66)
Mediana de seguimiento en meses (rango)	7 (3-41)	21 (3-38)
Mediana de tamaño tumoral en centímetros (rango)	1 (0,01-3,00)	1 (0,01-3,00)
Porcentaje de receptores de estrógeno (rango)	75 (20-95)	75 (0-90)
Porcentaje de receptores de progesterona (rango)	45 (0-80)	60 (0-90)
HE: Hematoxilina-eosina. IHQ: Inmunohistoquímica. BM: Biología molecular. MAG: Mamaglobina.		

Tabla III. Resultados obtenidos en los 43 casos estudiados.

gionares, permitiendo que no sufran sobretratamiento. Debido a que numerosos artículos publicados han postulado que la recurrencia de la enfermedad se manifiesta luego de 10 años de seguimiento, creemos que estos casos deben ser seguidos clínicamente a más largo plazo. En caso de que nuestros hallazgos sean corroborados en el futuro, determinaciones por BM podrían modificar la estadificación y tratamiento de las pacientes con cáncer de mama.

Reconocimiento

Agradecemos a la Dra. Daniela Allende por su esmero en los comienzos del proyecto, a Irene Rigos por su apoyo técnico, a Héctor Corradini por su colaboración en el área de medicina nuclear, a Hugo Krupitzki por el asesoramiento estadístico, a Valeria Melia por la revisión del resumen en inglés, a CEMIC por el Subsidio Anual para Profesionales Jóvenes-2005, y a la Fundación Alberto J. Roemmers, por el financiamiento económico.

REFERENCIAS

1. Ellis I, 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. Lyon: IARC Press; 2003.
2. Carter C, Allen C, Henson D. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* 1989; 63: 181-187.
3. Fisher E, 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. Wenche R, Per B, Berit S, Jahn N. Occult metastases in axillary lymph nodes as a predictor of survival in node-negative breast carcinoma with long-term follow-up. *The Breast Journal* 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 D. 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. Singletary E, Allred CA, Ashley P, et al. Revision of the American Joint Committee on cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20: 3628-3636.
10. Klug W, Cummings M. Conceptos de Genética. 5ª Ed. Prentice Hall, Madrid, 1999.
11. Kaplan J, Delpech M. Biologie moléculaire et médecine. De la biologie à la clinique. 2e Ed. Flammarion Médecine-Sciences, Paris, 1993.
12. Gillanders W, Mikhitarian K, Hebert R, et al. Molecular detection of micrometastatic breast cancer in histo-

- pathology-negative axillary lymph nodes correlates with traditional predictors of prognosis. *Ann Surg* 2004; 239: 828-840.
13. Liberman L. Pathologic analysis of sentinel lymph nodes in breast carcinoma. *Cancer* 2000; 88: 971-7.
 15. Dowlatshahi K, Fan M, Bloom K, Spitz D, Patel S, Snider H Jr. Occult metastases in the sentinel lymph nodes of patients with early stage breast carcinoma: a preliminary study. *Cancer* 1999; 86: 990-996.
 16. Goldhirsch A, Glick J, Gelber R, et al. Meeting Highlights: International Experts Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2005. *Ann Oncol* 2005; 16: 1569-1583.
 17. 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.
 18. 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.
 19. 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.
 20. Denninghoff V, Allende D, Paesani F, et al. Sentinel lymph node molecular pathology in breast carcinoma. *Diagn Mol Pathol* 2008; 17: 214-9.
 21. Blaheta H, Schitteck 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.

DEBATE

Dr. Ábalo: Muy bien la presentación Doctor, lo felicito. El Dr. Paesani está debutando en este tipo de presentaciones así que hay que estimularlo y apoyarlo. Yo quería hacer un comentario. Nosotros presentamos hace 2 años este trabajo, con menos casos (cuando recién empezábamos), y nos planteábamos muchas dudas y muchas hipótesis. Por ejemplo, queríamos saber si esta técnica de biología molecular permitía rescatar a algunas pacientes que tenían axila negativa, por los otros métodos, con esto que nosotros encontrábamos. No podría asegurar que

son metástasis, micrometástasis o células sueltas dentro de los ganglios. La técnica nos permite identificar este tipo de cosas y podríamos asimilarlo a células sueltas o a micrometástasis, para darle un nombre. Realmente la técnica lo permite, porque hasta más de un 40% de pacientes que son negativas para las otras técnicas, se detectan con esto; o sea, que uno de nuestros primeros objetivos, aparentemente estaba cumplido. El segundo de los objetivos, y quizás el más importante, era ver qué pasaba con el seguimiento de estas pacientes. En esa época teníamos muy pocos casos y muy pocos seguimientos; ahora tenemos un poco más de casos y un poco más de seguimientos. El seguimiento hasta ahora no nos ha demostrado nada, porque las pacientes que son biología molecular positiva o negativa, tienen una evolución similar. Tuvimos dos recurrencias, una en cada grupo, así que no podemos sacar de esto ninguna conclusión. Por eso estamos, en este momento, en una etapa de seguir o no seguir con este proyecto, o de incorporarle algún otro marcador molecular para darle un poco más de especificidad; lo estamos evaluando. Hasta acá llegamos, tenemos dos caminos: o continuamos con algún otro marcador, o paramos acá y le damos seguimiento y tiempo a estas pacientes, a ver si podemos encontrar algún resultado.

Dra. Noblía: Dos preguntas. La primera, cuando ustedes tienen la biología molecular positiva, ¿no toman absolutamente ninguna conducta, tratamiento adyuvante, ni vaciamiento?

Dr. Paesani: Ninguna.

Dra. Noblía: Entonces, pregunto, ¿cuál es el costo de cada estudio, y cuánto tiempo les demanda? Me pareció muy interesante el trabajo, muy bien presentado, pero yo realmente me preguntaba si tiene sentido seguir haciendo esto, si ustedes no van a tomar conducta y ven que no hay modificaciones en la sobrevida. Como usted dice, igual hay que esperar 10 años para saber. Realmente, ¿vale la pena por lo que sale

económicamente y en tiempo, y no nos aporta nada, por lo que veo?

Dr. Paesani: Con respecto a los costos creo que la Dra. Valeria Denninghoff, que es la bióloga molecular, va a responderlo mejor.

Dra. Denninghoff: En realidad los tiempos no son muy largos; entre 4 ó 5 días hábiles se puede informar. En este caso es investigación, estamos más relajados, lo hacemos con tiempo y cuando la asistencia nos lo permite. El inconveniente que yo veo es que es material en fresco; o sea, que tienen que estar entrenados en el quirófano para guardar ese material, por medio de nitrógeno líquido o biobanco, o un inhibidor de RNA, para poder transportarlo. Ése es el inconveniente que yo veo, más que el costo. El costo en reactivos, como todo lo que es molecular, podemos hablar entre 200 y 300 pesos; no sería el punto de impacto, si esto realmente tiene una implicancia clínica.

Una de las cosas que quería agregar a lo que dijo el Dr. Ábalo, es que los 2 casos que tuvimos son locales/regionales. El ganglio centinela no es criterio de evaluación; o sea, los márgenes sí son criterio de evaluación de local/regional. Estamos esperando la metástasis a distancia. Este mismo trabajo lo hicimos anteriormente en el Servicio, algo con melanoma. El seguimiento fue mucho más corto, tuvimos una buena respuesta. No sabemos si mamaglobina va a ser el marcador, pero creemos que va a haber un marcador molecular que nos va a permitir poder reestadificar a las pacientes y poder trabajar sobre el 30% de éstas. No sabemos si vamos a agregar más retrospectivamente, porque ahora nos permite, ya tenemos congelado el material, entonces podemos volver para atrás con estas mismas pacientes.

Dr. Dávalos Michel: Creo que son siempre bienvenidos los trabajos prospectivos. Yo quisiera hacer algunas preguntas o comentarios. Uno es que hace 2 años, en esta misma presentación, el Dr. Elsner decía que no podía afirmar si eran células metastásicas o células epitelia-

les. Ahora parece que con este nuevo marcador MAG-A3, creo que dice que son células metastásicas. Entonces, da la impresión que ahora con la nueva tecnología detecta metástasis moleculares y no células epiteliales. La otra era hacer una correlación entre esta presencia de metástasis moleculares con otros factores histológicos de pronóstico. Lo cuarto sería si cambian la conducta ante la presencia de estas micrometástasis por el MAG-A3. Y segundo, la recidiva mamaria es local, la recidiva ganglionar es regional. Yo creo que si son recidivas mamarias las que tuvieron, son recidivas locales no regionales.

Dr. Paesani: Con respecto al marcador, éste es un trabajo que está recientemente publicado. De todas maneras la inmunohistoquímica que se utiliza para citoqueratina también es un marcador epitelial. Cuando usamos técnicas de inmunohistoquímica también estamos detectando células epiteliales al igual que con mamaglobina. Quizás estos nuevos marcadores y antígenos específicos de tumores nos permitan saber a ciencia cierta que éstas son células tumorales en el ganglio. Quizás sea una de las próximas líneas en este trabajo que estamos presentando. En cuanto a la otra pregunta, no observamos ninguna correlación. Nos llamó la atención que, si bien uno espera que los tumores HER-2/neu positivos sean de peor pronóstico y tengan más riesgo de tener metástasis, no fue en este caso. La mayor parte de las pacientes que tenían células detectadas por biología molecular en el ganglio centinela, no tenían HER-2/neu positivo y no había diferencias en el grado histológico, en la invasión linfovascular, ni en los tipos histológicos tumorales.

Dr. Julián Mosto: Primero, los quiero felicitar porque el trabajo me pareció muy bueno. Tengo dos preguntas. Una es, si sobre esos 16 casos que fueron negativos con citoqueratina y con hematoxilina-eosina, retrospectivamente al ver que eran positivos con biología molecular, se hizo un estudio más exhaustivo, de más cortes y con más inmunohistoquímica, para descar-

tar realmente que no hubiera, siendo este estudio más exhaustivo, células sueltas o micrometástasis. La otra pregunta y un comentario, ver si no hubo contaminación. Si no pudo haber contaminación o existe la posibilidad de contaminación en la biología molecular en este tipo de proteínas. El comentario en cuanto a comparar la citoqueratina con inmunohistoquímica y biología molecular; lo que pasa es que con la citoqueratina, nosotros vemos que realmente son células neoplásicas, en biología molecular no sabemos qué tipo de célula es la que estamos viendo, solamente sabemos que tiene esa expresión génica.

Dra. Deninghoff: Quería primero contestar una pregunta anterior, lo del ganglio centinela y la expresión de la mamaglobina. En realidad cuando uno busca un marcador molecular, usa como control negativo el ganglio. En ganglios normales no había mamaglobina; tenemos controles negativos. Entonces, no importa si es epitelial o no, es un aumento de expresión de algo que está en una célula que no se expresa normalmente en el ganglio; porque es la definición de marcador o biomarcador. Nosotros en la rutina siempre hacemos cortes seriados, y cuando tenemos el caso de biología molecular, siempre sabemos que cuando uno corta un pedacito de biología molecular puede estar sacando ese pedacito para la inmunohistoquímica. Tenemos en otro tipo de trabajo, en otro tipo de patología, antecedentes que, al cortar una parte, uno puede estar sacando ese pedacito que justo tenga células aisladas y ese pedacito no va a ser estudiado. ¿Cómo lo hemos solucionado? Ahora haciendo en el biobanco criopreservación en taco, entonces se saca una viruta y de ese mismo taco se puede confirmar la inmunohistoquímica con

anticuerpos sobre eso y volver para atrás el proceso; ése es el cambio que vamos a hacer para adelante. En cuanto a la contaminación, si hay contaminación en el laboratorio, generalmente se hacen de a tandas. Nosotros tenemos en la misma tanda calles con positivos, positivos para A y B, negativos; entonces, si hay una contaminación uno lo ve en toda la tanda. Por lo tanto, no consideramos que haya contaminación en ese aspecto.

Dr. Julián Mosto: ¿La inmunomarcación la hacen seriada? Por ejemplo, tienen 10 cortes y le hacen inmunomarcación a los 10 cortes de 3 ganglios centinela; o sea, serían 30 inmunomarcaciones con citoqueratina.

Dra. Deninghoff: Para este trabajo, sí.

Dr. Dávalos Michel: Hasta ahora, en la clasificación no se sabe lo que significan las células sueltas, no se sabe lo que significa la metástasis con inmunohistoquímica, no se sabe lo que significa la punción de médula ósea. Entonces, si tienen medios, hay que seguir investigando para que algún día sepamos lo que significan estas alteraciones moleculares o histoquímicas. Si tienen medios para hacerlo, yo creo que tendrían que seguir haciéndolo.

Dr. Allemand: Como ejerzo hoy la presidencia de la Reunión Científica, voy a hacer un comentario. Como decía recién el Dr. Dávalos Michel, y reafirmando lo que decía, creo que este trabajo tiene un gran entusiasmo. En medicina muchas veces se encuentran hallazgos absolutamente casuales. Con ese material y con esa disponibilidad de recursos, yo seguiría buscando, porque a veces aparecen cosas que nos sorprenden. Insisto, la ciencia se ha nutrido de cuestiones casuales. Me parece muy bien y lo felicito Dr. Paesani por el entusiasmo puesto.