



REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA  
UNIVERSIDAD DE CARABOBO SEDE ARAGUA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ESCUELA DE MEDICINA "DR. WITREMUNDO TORREALBA"  
DEPARTAMENTO DE GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA

"DETECCION Y VALOR PRONÓSTICO DE MAMMOGLOBINA Y MAGE-A3 EN  
GANGLIOS LINFÁTICOS AXILARES DE PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA"

NOVIEMBRE, 2013

REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA  
UNIVERSIDAD DE CARABOBO SEDE ARAGUA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ESCUELA DE MEDICINA "DR. WITREMUNDO TORREALBA"  
DEPARTAMENTO DE GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA

"DETECCION Y VALOR PRONÓSTICO DE MAMMOGLOBINA Y MAGE-A3 EN  
GANGLIOS LINFÁTICOS AXILARES DE PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA".

Trabajo presentado como requisito para el ascenso al escalafón de  
Profesor Asociado de la Universidad de Carabobo

Autora. Rosio Ortega  
C.I. 8.574.391  
Profesora Agregada de la Cátedra de Ginecología y Obstetricia  
Tutor: Emilia Barrios

NOVIEMBRE, 2013

## DETECCIÓN DE MICROMETÁSTASIS DE CÁNCER DE MAMA EN GANGLIOS LINFÁTICOS AXILARES POR RT-PCR PARA MAMMOGLOBINA Y MAGE-A3.

AUTOR: ROSIO ORTEGA.

---

### RESUMEN:

El cáncer de mama es la segunda neoplasia más frecuente en el mundo y es la primera causa de cáncer en la mujer, en Venezuela es la segunda causa de muerte por cáncer en la mujer. El status ganglionar está establecido como factor pronóstico importante y al comprobarse metástasis axilar la abstención de tratamiento lleva a alto riesgo de recurrencia, así que la identificación de la extensión a estos ganglios linfáticos es crucial para la determinación del pronóstico, evolución y tratamiento. Se pretende demostrar la sensibilidad de la RT-PCR, a través de la detección de ARNm de MAGE-A conjuntamente con el ARNm de mamoglobina humana (MMG), para determinar la presencia de células tumorales metastásicas en ganglios linfáticos axilares en pacientes con cáncer de mama. Encontramos que la positividad simultánea de los marcadores pronosticó una evolución menos favorable independientemente del tamaño del tumor y que la ausencia simultánea de MMG y MAGE A- predijo un curso menos agresivo de la enfermedad, tendencia que se observa tanto en GLA+ como en GLA-, y que la presencia concurrente de ambos marcadores independiente del tamaño del tumor primario infiere una mayor agresividad del cáncer evidenciada por disminución del ILE, lo que pudiese extrapolarse como pronóstico del comportamiento de esta enfermedad y ser explicado en GLA- por el diagnóstico de micrometástasis no encontradas con la técnica habitual HE.

**Palabras clave:** cáncer de mama, micrometástasis, RT-PCR, MAGE-A3, MMH, factores pronósticos.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es la segunda neoplasia más frecuente en el mundo y es la primera causa de cáncer en la mujer con una frecuencia media de 411.093 muertes por año. Actualmente todas las mujeres tienen un riesgo de padecer cáncer de mama solo por su género, se ha establecido que 1 de cada 7 a 14 de ellas padecerá la enfermedad durante su vida, con un riesgo de morir por esa causa que varía entre 3 y 70% dependiendo de lo avanzada que esté la enfermedad al diagnosticarla (Millán, 2008). En Venezuela es la segunda causa de muerte por cáncer en la mujer, en el 2003 cada 24 horas fallecieron 3 venezolanas por esta afección siendo detectados diariamente 9 nuevos casos de cáncer de mama. Aun cuando el carcinoma de cuello uterino llevó la delantera. Es de hacer notar que la mayoría de las pacientes detectadas en ese año tenían entre 35 y 44 años. (1)

El pronóstico de una paciente con cáncer de mama viene marcado por la existencia de una serie de factores denominados genéricamente factores pronósticos y por la situación clínica en la que se encuentre, ya sea local, regional o sistémica (estadios), El objetivo de estos factores pronósticos es el de proporcionar al clínico indicaciones sobre el riesgo vital y de recidiva. (2) En el diagnóstico del cáncer de mama el status ganglionar está establecido como factor pronóstico importante, y al comprobarse la metástasis axilar la abstención de tratamiento local sobre la axila conlleva a un alto riesgo de recurrencia, por lo que la identificación de la extensión del cáncer a estos ganglios linfáticos es crucial para la determinación del pronóstico, evolución y tratamiento. (2)

La detección de las metástasis se hace en muestras obtenidas por biopsia que implica la extracción de los ganglios linfáticos axilares seguida por el examen histológico convencional con hematoxilina y eosina. Una desventaja del examen histológico es que en la etapa inicial pueda pasar desapercibida la enfermedad y tumores que son catalogados como ganglios linfáticos negativos tengan una evolución desfavorable, con aparición de metástasis y muerte. (3, 4, 5) Se pueden hallar focos metastásicos en el 13% de ganglios considerados negativos, si se cortan seriadamente, y este porcentaje incrementa al 20% si se emplean técnicas de inmunohistoquímica (6). En casos que son diagnosticados posteriores a cortes seriados y con el uso de técnicas complementarias los no diagnosticados oscilan entre 10 y 47%. (7, 8)

En el estadio inicial los parámetros morfológicos no discriminan el 30% de los casos que evolucionarán desfavorablemente, casos que posiblemente son extensión de la enfermedad no diagnosticada y que son susceptibles de tratamiento sistémico el que por su toxicidad no puede aplicarse de forma indiscriminada. Además en el cáncer de mama tumores semejantes se comportan y

responden de forma distintas al tratamiento hormonal o a la quimioterapia, su comportamiento no es uniforme ni totalmente predecible por lo que es esencial disponer de otros criterios de selección de terapia. (2)

Las metástasis se clasifican según su tamaño, se denominan macrometástasis cuando son mayores a 2 mm, micrometástasis iguales a 2mm y mayores a 0,2 mm, células tumorales aisladas (CTA) iguales y menores 0,2 mm. Algunos autores han observado que la presencia de micrometástasis e incluso de CTA se asocian con una reducción del intervalo libre de enfermedad (ILE), de la supervivencia y del aumento de recurrencia (9, 10). La detección de micrometástasis mediante la inmunohistoquímica, citometría de flujo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha permitido revelar focos mínimos en ganglios linfáticos histológicamente negativos, por ello se justifica identificar los grupos de alto riesgo para terapia oportuna y evitar los efectos de la aplicación de esta en pacientes de bajo riesgo. (11, 12, 13)

El método de la reacción en cadena de la polimerasa ha sido capaz de detectar micrometástasis, amplificando y localizando pequeñas cantidades de ADN de un gen específico, evaluando gran cantidad de tejido mediante el empleo de iniciadores específicos para células malignas de origen mamario. La técnica reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa (RT-PCR) permite la amplificación y localización de moléculas de ARN y a través de esta técnica se han identificado células metastásicas en 40% de ganglios negativos por procedimientos básicos. (14) Estudios previos exponen la importancia del status ganglionar para el tratamiento ( 2, 15, 16), pero el significado clínico de micrometástasis y células tumorales aisladas está aún por definirse, no existe evidencia suficiente de aplicación de técnicas de biología molecular en el estudio de detección de micrometástasis en el cáncer de mama y estas se realizan generalmente en el marco de la investigación (17, 18), si la PCR se validara como un detector de la recurrencia de la enfermedad proveería un complemento poderoso para los análisis histológicos.

En este estudio se pretende demostrar la sensibilidad de la RT-PCR, a través de la detección de ARNm de MAGE-A conjuntamente con el ARNm de mamoglobina humana (MMG), para determinar la presencia de células tumorales metastásicas en ganglios linfáticos axilares en pacientes con cáncer de mama.

El gen de la MMG que se encuentra en el cromosoma 11q12-13, tiene una secuencia de aminoácidos similar a la de proteínas secretoras epiteliales pertenecientes a la familia de la uteroglobina, que son codificadas por genes de la misma región cromosómica. La MMG es

expresada por células epiteliales de la mama, de ahí su uso para detectar células cancerosas de mama y debido a esta expresión casi exclusiva es un prometedor marcador y por tanto puede ser uno de los primeros relativamente específicos para cáncer de mama. (19) Un estudio con MMG y MASPIN en sangre periférica reflejó progresión de la enfermedad y probables implicaciones predictivas en la evaluación de la eficacia del tratamiento (20, 21)

El gen de MAGE-3 no se expresa en tejido normal, excepto en la placenta y células germinales masculinas, pertenece a una familia de genes relacionados y localizados en el cromosoma X, los péptidos del gen de MAGE-3 son inmunogénicos y pueden inducir citotoxicidad y anticuerpos. Ha sido utilizado para detección de células cancerosas en ganglios centinelas. (22, 23, 24)

El diagnóstico y el significado clínico de micrometástasis y CTA ha sido variable y se necesitan estudios que ayuden a su discernimiento, partiendo de ese marco referencial es evidente la importancia del problema y la necesidad de delimitarlo en nuestro ámbito, y por ello la presente investigación tendrá como objetivo la detección por técnicas de inmunohistoquímica y biología molecular de micrometástasis de cáncer de mama mediante RT-PCR de MMG y MAGE A3, y por técnica de inmunohistoquímica citoqueratina A1/A3 en ganglios linfáticos axilares negativos al estudio histológico con hematoxilina y eosina en mujeres con cáncer de mama que fueron protocolizadas para cirugía conservadora o radical con vaciamiento axilar, en el Instituto de Oncología "Dr. Miguel Pérez Carreño", en Valencia estado Carabobo durante cuatro años. Complementándose con la evolución del paciente para indagar en el significado clínico y valor pronóstico.

Con este trabajo se plantea contribuir con el problema mediante técnicas más finas (sensibles y específicas) que alcancen el nivel de detección hasta micrometástasis y poder disponer de un pronóstico temprano y un tratamiento oportuno. La enfermedad metastásica oculta puede ser un indicador de recurrencia en casos sin metástasis ganglionar detectada por métodos tradicionales, de ahí la importancia de un estudio minucioso y de un diagnóstico preciso.

Un 30% de los pacientes con cáncer de mama con ganglios linfáticos negativos estudiados mediante técnicas histológicas convencionales tendrán recidiva tumoral y/o fallecen. Esta inesperada mala evolución, en casos presumiblemente curados podría deberse, entre otras causas, a la presencia de micrometástasis linfoganglionares no detectadas en el estudio de rutina: hematoxilina-eosina. Esto implicaría que una proporción importante de los tumores podrían estar subdiagnosticados. (7, 8) Esta supuesta infraestadificación podría deberse a la falta de sensibilidad del estudio histológico convencional para detectar las micrometástasis ganglionares, la técnica

habitual de disección de los ganglios, corte de los mismos y selección de una parte para inclusión en parafina y tinción mediante hematoxilina-eosina, plantea dos problemas: únicamente examinamos una porción del tejido ganglionar, y la tinción rutinaria puede no conseguir ver pequeños cúmulos de células tumorales (25), aunque en el procesamiento se haya incluido realizar secciones a distintos niveles para detectar metástasis de 2mm, se sugiere que el análisis se debe complementar con otros métodos cuando la hematoxilina-eosina es negativa para detectar enfermedad. (17)

Que en un 30% de las pacientes se presente progresión de la enfermedad, fundamenta el empleo de metodologías en busca de poblaciones celulares metastáticas poco representadas y no detectables en el examen microscópico convencional (micrometástasis), ya que el pronóstico y tratamiento de pacientes con cáncer de mama está influenciado por la existencia de metástasis en ganglios axilares. Neville, ya desde 1991 concluye en estudio con 921 pacientes, que la presencia de micrometástasis en ganglio linfático se asocia con menor supervivencia libre de enfermedad y menor supervivencia global. (26)

Revisiones recientes reflejan diferencias notables entre distintos marcadores, lo que permiten seleccionar a los que han sido objeto de mayor número de estudios con coincidencia de resultados. Se requiere poner especial atención a este grupo de factores pronósticos capaces de reforzar la información disponible por los parámetros clásicos (tamaño tumoral, estado ganglionar, tipo histológico y grado de diferenciación) y susceptibles, por tanto, de configurar un nuevo panel de pronóstico y diagnóstico para el cáncer de mama. Y aunque el desarrollo de nuevas técnicas moleculares para investigar micrometástasis es un área de interés creciente en investigación, en nuestro país no se realizan estudios de esta naturaleza y son realmente escasos los marcadores utilizados a nivel de tumor primario.

Para demostrar y evaluar el impacto de la detección de micrometástasis en la evolución clínica de los pacientes, se debería determinar la utilidad de estos hallazgos por medio de estudios prospectivos con el seguimiento clínico de las pacientes. Un aspecto a enfatizar, finalmente, es la necesidad de unificación metodológica, tanto en estudios de investigación como en aplicaciones asistenciales y no perder de vista que tanto las técnicas de inmunohistoquímica como las de biología molecular, requieren personal técnico cualificado con experiencia prolongada, metodologías complejas, sistemas rigurosos de validación de técnicas y control de calidad sistemático, para garantizar resultados fiables.

Algunas de las discrepancias entre distintos trabajos de investigación son atribuibles a diferencias metodológicas y en la práctica asistencial, los errores de laboratorio se traducen en errores terapéuticos y la interpretación de los resultados debe estar supervisada por profesionales con formación en patología y en inmunología por lo cual el equipo de asesores de ésta investigación estuvo conformado por biólogo doctor en inmunología, anatomopatólogos, y profesionales de reconocida trayectoria en la investigación.

La detección y eliminación de enfermedad mínima residual en pacientes con tumores sólidos es uno de los principales objetivos en oncología clínica. Deben realizarse estudios con nuevos métodos que permitan la identificación de células tumorales en ganglios regionales, sangre periférica y médula ósea. Enfocarse hacia nuevos abordajes de diagnóstico para identificar enfermedad mínima residual, apoyándose en el papel de la presencia de micrometástasis como un factor pronóstico que influya en la supervivencia libre de enfermedad y global. Contribuir con el problema mediante técnicas más finas (sensibles y específicas) que alcancen el nivel de detección hasta micrometástasis y poder disponer de un pronóstico temprano y un tratamiento oportuno

Para la correcta interpretación de este trabajo es importante la definición de cierta terminología aplicada a la oncología, por lo que se explicará de brevemente.

#### 1. CLASIFICACIÓN TNM DEL CÁNCER DE MAMA:

La clasificación para determinar la extensión anatómica de las neoplasias se utiliza en el cáncer de mamas desde hace 25 años. Los continuos cambios en el diagnóstico y tratamiento hacen que se introduzcan reiteradas modificaciones en esa clasificación. El sistema de estadificación TNM para el cáncer de mama se basa en el tamaño del tumor primario (T), si el tumor se ha diseminado a los ganglios linfáticos regionales en las axilas (N), y si el tumor se ha propagado a una región distante (M). Los tumores de mayor tamaño, de propagación nodal y metastásicos tienen un mayor número de estadiaje y un peor pronóstico. La estadificación principal incluye el estadio 0 carcinoma ductal in situ, estadios I-III potencialmente curables y el estadio IV, cáncer avanzado diseminado a huesos, pulmones, hígado o cerebro y se considera incurable. El sistema de estadificación del American Joint Committee on Cancer (AJCC) proporciona una estrategia para agrupar a las pacientes según el pronóstico. Las decisiones terapéuticas se formulan, en parte, de acuerdo con categorías de estadificación pero, principalmente, de acuerdo con el tamaño del tumor, el estado de los ganglios linfáticos, los índices de los receptores de estrógeno y progesterona en el tejido tumoral, el estado del receptor



del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2/neu), el estado menopáusico y la salud general de la paciente. (27)

## 2. FACTORES PRONOSTICOS EN CANCER DE MAMA

Los factores pronósticos son una medida que en ausencia del tratamiento adyuvante estima el riesgo de recurrencia y de muerte y que identifica población homogénea de pacientes, reconoce subgrupos de alto riesgo, predice resultados de intervenciones y terapéuticas, comparar resultados de tratamientos, clasifica la evolución del tumor y permite planificar estrategias del seguimiento. Los factores pronósticos implican la asociación con un periodo libre de enfermedad, en tanto que los predictivos se asocian con la respuesta a una terapéutica empleada. Los más importantes son el tamaño tumoral, la afectación ganglionar axilar, el grado histológico y los receptores hormonales; enfatizaremos los que contrastaremos con los resultados de la investigación y en los que esté globalmente reconocido su papel.

2.1. Estado ganglionar: en el presente el mejor indicador pronóstico en pacientes con cáncer temprano de glándula mamaria es la presencia o ausencia de metástasis en los ganglios linfáticos axilares. El 20 a 30% de las pacientes con ganglios negativos presentan recurrencia dentro de los primeros 10 años, mientras que recurren el 70% de los pacientes con ganglios axilares positivos. Sin evidencia de metástasis ganglionares, la supervivencia a los cinco años, es aproximadamente 80-90%; y en presencia de algún ganglio positivo disminuye al 75%, el 60% de ellos con uno a tres ganglios positivos y el 35% con cuatro o más. De esta forma, la presencia de ganglios axilares microscópicamente tumorales afecta desfavorablemente el pronóstico. La afectación de 1 a 3 ganglios conlleva a más del 60% de recidiva en los 10 primeros años y tiene una incidencia de recidivas superior al 80% a los 10 años. (29, 30) En 9 a 13 % de las pacientes con ganglios negativos se pueden encontrar pequeños focos microscópicos metastásicos en múltiples rebajes teñidos con hematoxilina-eosina y el porcentaje aumenta hasta en un 15 a 20% cuando se utiliza inmunohistoquímica para detectar células neoplásicas metastásicas en los ganglios. (2)

Una investigación prospectiva del Grupo de Estudio Internacional del Cáncer de Mama, señaló que los cortes seriados de adenopatías axilares consideradas libres de enfermedad después de un examen histológico sistemático revelaron micrometástasis en un rango de entre el 9% y el 20% de las pacientes que tuvieron peor intervalo libre de enfermedad (ILE) y supervivencia global (SG) después de cinco años, que aquellas cuyos ganglios se mantuvieron negativos después de los cortes seriados. Los métodos inmunohistoquímicos para el diagnóstico

de metástasis ocultas mostraron más recurrencia y peores cifras de supervivencia para las mujeres con carcinoma ductal infiltrante, que se convertían en ganglio-positivas como resultado de los estudios especiales (2).

2.2. Tamaño tumoral: el tamaño del tumor primario es uno de los factores pronósticos más importantes, con la afección ganglionar constituyen dos de los tres criterios utilizados para la clasificación (estadiaje) y tiene una asociación directa con la supervivencia y el estado ganglionar en la paciente. Las metástasis están presentes en el 26% de los tumores de 1 cm o menos de diámetro, comparado con el 78% en los que tiene más de 10 cm. Un tumor de máximo 2 cm de diámetro tiene un pronóstico y una supervivencia mejor si se compara con tumores más grandes. Los tumores de diámetro mayor de 5 cms tienen una frecuencia de recidiva que sobrepasa al 70% a los 10 años (29). Rosen et al, encontraron supervivencia libre de enfermedad de 91% a los 10 años y 87 % a los 20 años para pacientes con carcinoma ductal o lobulillar infiltrante con tamaño del tumor  $\leq 1$  cm, por otro lado aquellos pacientes con tumores mayores tuvieron un periodo de intervalo libre de enfermedad de 70% y 60% a los 10 y 20 años respectivamente.( 30)

2.3. Grado histológico: factor pronóstico importante, ha demostrado tener valor para predecir la supervivencia en pacientes con cáncer de mama. Como regla, los carcinomas de bajo grado tienen un mejor pronóstico que los de alto grado. (32, 33) El alto grado histológico se ha relacionado con mayor frecuencia a metástasis, recurrencias tumorales, muerte por enfermedad metastásica, menor intervalo libre de enfermedad y supervivencia global más corta. (2) El grado histológico no se utiliza en el estadiaje de la enfermedad, pero si en el índice pronóstico de Nottingham (NPI), que incorpora los tres indicadores pronósticos más potentes de esta categoría: el estado de los ganglios de la axila, el tamaño tumoral y el grado histológico. Su consistencia como factor pronóstico independiente se ha demostrado. (32)

2.4. Estadiaje: esencial en la evaluación del tumor y en la determinación del tipo de tratamiento; la pauta es que en las pacientes con un estadiaje mayor de la enfermedad haya un aumento de la recurrencia, recidivas y disminución de ILE y de la SG (33).

2.5. Receptores hormonales: la expresión de receptores de estrógeno (RE) y progesterona (RP) positivos se correlaciona con tumores de bajo grado histológico que responden a tratamiento hormonal sobretodo en pacientes post-menopáusicas. (2) Aproximadamente del 55% al 65% de los carcinomas primarios de mama y del 45% al 55% de sus metástasis son receptores

estrogénico-positivos (RE+). Se ha demostrado que los tumores RE positivos responden a la administración de esquema hormonal entre el 55% y el 60% y alrededor del 8% de las RE negativos tienen mejor respuesta a las quimioterapias citotóxicas. Los tumores mejor diferenciados son RE+ y tienen un mejor pronóstico. Por otro lado, el 45% al 60% de los cánceres de mama primarios y metastásicos tienen receptores de progesterona (RP). La presencia de RE y RP aumenta la probabilidad de respuesta a los tratamientos hormonales entre el 55% y el 80% en pacientes con RE+ y la falta de RP está asociada con peor pronóstico. Hoy día, los RE y RP son considerados como indicadores pronósticos independientes e indispensables. (2)

2.6. Oncogén C-erbB-2 (her-2/neu o her 2): c-erbB-2 es un oncogén del cromosoma 17 que codifica una proteína de membrana de 185 kD. Se informa ampliada en aproximadamente 30% de los carcinomas de mama y se concluye que es un factor pronóstico de la supervivencia total y del periodo libre de enfermedad en pacientes con cáncer de mama y ganglios linfáticos positivos. Esta proteína ha sido asociada con un grado histológico pobre, extensión a ganglios axilares y número de ganglios afectados; además, la amplificación del oncogén HER-2 se correlaciona con la ausencia de receptores estrogénicos y de progesterona. La ampliación del gen Her 2 / nev se detecta entre un 25 – 70% de los cánceres de mama y disminuye la supervivencia de la enfermedad (Clement et al., 2004, Zudaure, 2004). Fue introducido como un potente factor de mal pronóstico, actualmente se considera una diana terapéutica con la introducción del herceptin en la terapia antineoplásica, anticuerpo humanizado contra la porción extracelular de la oncoproteína p185 HER-2/c-erbB2/neu. (34)

2.7. Ki 67: antígeno que identifica las células proliferantes dentro de un tumor, por tanto cuanto mayor es, más agresivo es el tumor. La positividad se correlaciona con el grado de diferenciación tumoral, invasión vascular, metástasis en ganglios linfáticos y se relaciona de forma inversa a la presencia de receptores hormonales. (2)

2.8. P 53: el gen p53 se localiza en el cromosoma 17 y se considera un regulador negativo del crecimiento celular. Su mutación constituye alteración genética frecuente en neoplasias malignas y se considera un factor de mal pronóstico porque determina pérdida de la función supresora, activación del crecimiento celular y aumento del riesgo de progresión de la neoplasia. (2)

2.9. Invasión estromal: se han observado ciertas características del tumor que se relacionan con el estroma, los tumores que contienen mínima reacción estromal son bien

circunscritos, grado nuclear e histológico alto, reacción linfoplasmocitaria prominente, son receptores de estrógeno negativos. Por otro lado, los carcinomas con estroma fibrótico, esclerosis, con aspecto estelar son moderadamente diferenciados con escasa reacción linfoplasmocitaria y son receptores de estrógeno positivos. (2)

2.10. Invasión linfática y vascular: las metástasis viscerales de cáncer de mama se han observado en 67% de los pacientes con invasión en comparación con solo el 35 % de los pacientes sin ella. Así también las recurrencias son más frecuentes en pacientes con invasión vascular. . Los émbolos tumorales dentro de los vasos linfáticos predicen recurrencia local y sobrevida global más corta. Los émbolos tumorales linfáticos se encuentran en 10 a 15% de las pacientes con ganglios negativos, algunos estudios han demostrado pronóstico desfavorable en estas pacientes, especial. La invasión linfática y vascular tiene valor predictivo sobre recurrencia local precoz y metástasis distantes e indica una mayor probabilidad de fracaso terapéutico. (2)

### 3. PCR PARA LA DETECCIÓN DE MICROMETASTASIS EN TUMORES SÓLIDOS

La primera descripción del uso de la técnica de la PCR para la detección de neoplasias es del año 1988, utilizada en la leucemia mieloide crónica y en la leucemia linfocítica aguda. Desde entonces ha habido un importante incremento de publicaciones en la literatura avalando la utilidad de la PCR en la detección de células tumorales. La primera aplicación en tumoraciones sólidas fue para la detección de células de melanoma cutáneo a nivel de la circulación sistémica, en el año 1991. Mediante esta técnica se pudo detectar una sola célula de melanoma en 2 ml de sangre. (35) Se han publicado numerosos estudios clínicos para detectar la enfermedad mínima residual en tumores sólidos de acuerdo con la molécula diana utilizada, con el tumor primario y con la localización secundaria examinada. El análisis mediante PCR puede diseñarse para detectar una célula utilizando una estructura molecular específica -diana-. Estas moléculas diana pueden detectarse en la sangre periférica, en los nódulos linfáticos, en las biopsias de las localizaciones primarias y secundarias, en la médula ósea y en otros fluidos corporales.

Las células cancerígenas presentan alteraciones genéticas para desarrollar su potencial metastásico y podemos detectar estas alteraciones en la expresión genética a nivel tanto de ARNm como de ADN, en la mayoría de los tumores las alteraciones genéticas están restringidas al tumor y no se encuentran presentes en el tejido normal esto permite la detección de la célula cancerígena en su localización primaria y en la secundaria con cierto grado de especificidad.

Las translocaciones cromosómicas, se hallan característicamente en leucemias y linfomas específicos, tal como encontramos en la leucemia mielocítica crónica t(9;22) (cromosoma Philadelphia), en la leucemia promielocítica aguda, y en los linfomas no Hodgkinianos t(14;18)(q24;q21). (36) Son excelentes secuencias para el diagnóstico con la técnica de PCR, los genes procedentes de la reorganización en el punto de rotura, tras la fusión cromosómica. La RT-PCR fue utilizada ya en el año 1988, para determinar el ARNm de la translocación bcr/abl en sangre periférica de la médula ósea en pacientes con leucemia mieloide crónica. (37)

La RT-PCR es capaz de detectar con una gran sensibilidad, reagrupaciones cromosómicas específicas asociadas al linfoma de células B, o al Sarcoma de Swing, sin embargo, las translocaciones no son únicas de un tumor específico, tal como se evidencia por la translocación t(11;22) característica del sarcoma de Ewing, que también puede evidenciarse en neuroepiteliomas periféricos, tumores de Askin y en estesioblastomas. No todas las translocaciones son adecuadas para su detección mediante la técnica de la PCR. Algunas roturas cromosómicas, especialmente t(8;14)(q24;q32) que se observa en el linfoma de Burkitt, son altamente heterogéneas respecto de su posición en el ADN y expanden un área demasiado larga para unos primers específicos. (37, 36)

También pueden detectarse mutaciones puntuales, deleciones, reagrupaciones genéticas y amplificación de oncogenes, genes supresores tumorales, factores de crecimiento, o sus receptores. La detección de algunas alteraciones genéticas tiene implicaciones pronósticas, como la sobreexpresión de erb-B2 en el 30 % de carcinomas de ovario y en carcinomas de mama, que se asocian a una evolución desfavorable. Datos similares se han publicado acerca del gen n-myc en el neuroblastoma. (38)

Sin embargo, muchas mutaciones puntuales a menudo no son específicas para un nucleótido concreto y tienden a mutar el gen en múltiples puntos, tal como sucede con el gen tumor supresor p53 en el locus cromosómico 17p. Para detectar las diferencias entre el ADN nativo y el mutado en base a la estructura secundaria es útil la utilización de la técnica del polimorfismo de conformación de cadena sencilla (PCR-SSCP, single strand conformational polymorphisms). Las alteraciones del gen p53 se encuentran con frecuencia en muchos cánceres humanos, pero se ha comprobado su asociación con el síndrome de Li-Frument, para la tumorigénesis. (39)

La presencia de genes víricos o de productos genéticos en las células cancerosas nos permite detectar las células transformadas. (40) En los carcinomas de cérvix, la detección de subtipos específicos como virus del papiloma humano 16 o 18, ha derivado en implicaciones pronósticas. También se han encontrado virus del herpes humano 8 en pacientes afectados de sarcoma de Kaposi o leucemia del adulto por virus de la leucemia de células T humana (41). La expresión de la proteína core del virus de la hepatitis C se asocia con cambios en la expresión de ARN mensajeros específicos, incluyendo al gen SLC que puede estar involucrado en la fisiopatología del carcinoma hepatocelular (42).

La expresión específica de un gen en un tejido permite el desarrollo y diferenciación única de cada tejido, y es de gran valor para el diagnóstico del cáncer. En la actualidad el marcador mejor estudiado es el antígeno específico prostático (PSA) y el antígeno de membrana específico prostático (PSMA) en el cáncer de próstata, le siguen la hidroxilasa tirosina para el neuroblastoma y la tirosinasa y queratina para el melanoma maligno, la RT-PCR puede emplearse para detectar estos marcadores en localizaciones secundarias, con expresión no conocida del gen, por ejemplo, la mayoría de los estudios indican que las células que expresan el PSA no se encuentran normalmente en la sangre periférica o en los ganglios linfáticos, por lo que su presencia sería compatible con metástasis (42).

Se han postulado diversos marcadores que se expresan por tipos de cáncer diverso como el antígeno carcinoembrionario (CEA), citoquinas, telomerasas y la gonadotropina coriónica humana. Estos marcadores ofrecen la ventaja de que con una sola determinación es posible hacer un escrutinio para varias neoplasias, sin embargo, pueden aumentar de manera inespecífica.

Mediante la PCR podemos estudiar diferentes tejidos corporales, en busca del proceso metastásico. Por un lado, podemos estudiar la propia tumoración obtenida mediante biopsia o bien mediante exéresis, y por otro, los ganglios linfáticos, la médula ósea, la sangre periférica y otros líquidos biológicos. (40)

La PCR, permite la caracterización simultánea de múltiples marcadores, con una muestra relativamente pequeña y la detección de células malignas en la periferia del tumor, en comparación al análisis tradicional histopatológico El análisis de los marcadores metastásicos o de los serotipos virales congénitos, pueden ayudarnos como indicadores de pronóstico, tal como

sucede con el carcinoma cervical y el virus del Papiloma Humano, o en el carcinoma hepático y el virus de la Hepatitis C. (40)

En los rastreos para cáncer, la sangre venosa constituye una muestra accesible y poco costosa, permiten la detección de células cancerosas en neoplasias hematopoyéticas y en neoplasias no hematopoyéticas que se extienden por vía sanguínea, cualquier marcador ausente en la sangre periférica puede ser considerado para su uso en la detección de células cancerígenas y en médula ósea existe una buena correlación entre los enfermos con médula ósea positiva mediante PCR y un estadiaje histopatológico superior, así como con la diseminación metastásica. (40) Además de la sangre líquido ascítico en carcinoma hepatocelular o pancreático, la orina en carcinoma de células transicionales, las heces en carcinoma colorrectal, y el esputo de pacientes con carcinoma pulmonar. Los datos de la orina son más prometedores, se ha encontrado células exfoliadas de carcinoma de vejiga con mutaciones p53 o con alteraciones microsatélites que son predictivas de carcinoma de células transicionales. (43)

Se han detectado células tumorales en pacientes afectados de cáncer, mediante la RT-PCR, en las biopsias de ganglios linfáticos. La RT-PCR ha sido más sensible que los métodos tradicionales basados en anticuerpos, puesto que ha detectado la expresión de un marcador tumoral en un grupo de ganglios linfáticos que habían sido negativos mediante inmunohistoquímica. Estudios recientes retrospectivos de muestras de ganglios linfáticos incluidos en parafina y fijados con formol, han demostrado que aquellos pacientes que fueron negativos mediante histopatología convencional, pero positivos mediante RT-PCR, a lo largo de su seguimiento desarrollaron enfermedad metastásica durante los 5 años postoperatorios. Estos datos sugieren que el estadiaje de los ganglios linfáticos mediante RT-PCR puede ser un mejor predictor de la recurrencia de un cáncer. (44)

La biología individual de cada tipo de cáncer es diferente en cuanto a alteraciones genéticas, características de crecimiento, y predilección anatómica para la expansión metastásica. En carcinoma colorrectal la forma mutada de K-ras presenta una sensibilidad del 20-65%, en biopsias de muestras de tumor, y está presente en muestras no tumorales (especificidad del 75%) y CEA se ha detectado de manera variable (43%-84%) en sangre periférica, médula ósea y biopsias de tejido y para citoqueratina-20 se requieren más estudios para establecer una relación. En el cáncer de hígado se han utilizado, la alfa-fetoproteína (AFP), la albumina y algunos virus (virus hepatitis B y C). Alrededor del 90% de los adenocarcinomas de páncreas presentan mutaciones del codón 12 del gen K-ras. En el caso de carcinomas de células

transicionales se han determinado, mutaciones del gen p53 y del gen supresor tumoral del retinoblastoma, mutaciones del oncogén H-ras y la presencia de secuencias del virus papiloma humano. (42)

La RT-PCR para la detección de carcinoma de próstata ha sido uno de los modelos mejor estudiados, debido a la especificidad del antígeno específico prostático (PSA) para las células prostáticas. Los estudios clínicos nos muestran que la RT-PCR puede detectar células circulantes que expresan el PSA en un porcentaje elevado de pacientes con enfermedad metastásica y en un subgrupo de pacientes con enfermedad localizada. Las sensibilidades publicadas en la detección de las células que expresan el PSA en sangre periférica, varían de 0% al 88%. (42)

Existen numerosos estudios de marcadores que se asocian con el carcinoma de mama, y entre ellos se encuentran: deleciones del gen BRCA; amplificación de MDR-1 y HER-2/neu; mutaciones en el p53; isoformas de CD44; virus tumorales; marcadores específicos de tejido, como la queratina, citoqueratina, maspina y receptores de estrógenos; y también marcadores específicos de cáncer, como la telomerasa, PSA,  $\beta$ -HCG y CEA. La detección de marcadores específicos de epitelio como la queratina-19 y la citoqueratina-19, presenta generalmente una buena correlación con la presencia de metástasis. Los estudios clínicos con estos marcadores, suelen presentar una elevada sensibilidad (90-100%) y una elevada especificidad (90-100%).

La expresión del gen de la telomerasa puede estar muy elevada en todos los cánceres, y se detecta sobre todo en la mayoría de los pacientes con carcinoma de mama metastásico (77%), en algunos pacientes con un carcinoma confinado al órgano en cuestión (6%) y en ningún paciente sin carcinoma de mama. (0%). No se detectan similares asociaciones entre marcadores específicos de cáncer y el carcinoma de mama, entre ellos: PSA;  $\beta$ -HCG, o CEA. (42)

## MATERIALES Y MÉTODO

La población y muestra fue de ciento veinte y cinco (125) mujeres con cáncer de mama operadas y protocolizadas como cirugía conservadora o radical con vaciamiento axilar, en el Instituto de Oncología "Dr. Miguel Pérez Carreño", en Valencia estado Carabobo en el periodo comprendido entre los años 2004-2008, y las muestras archivadas en nitrógeno líquido en el Banco de Tumores del LabDEI (Laboratorio de Diagnóstico de Enfermedades Infecciosas de la Escuela de Bioanálisis). Excluidas pacientes embarazadas o en periodo de lactancia con cáncer de Mama y carcinoma de mama *in situ* de pequeño tamaño. En estos tumores, como



norma general, no se realiza linfadenectomía axilar porque no sobrepasan la membrana basal, siendo su malignidad local. En este estudio transversal, no experimental de naturaleza descriptivo, se incluyeron de la historia clínica, nombre y edad del paciente, número de historia clínica, fecha de la intervención, número de ganglios extirpados y ganglios con metástasis presentes o no por el estudio histológico con H-E , estadio clínico, tamaño y grado histológico del tumor, inmunohistoquímica para receptores hormonales, *ceb-2*, *Ki67* y la evolución clínica: el intervalo libre de enfermedad (ILE), si hubo evento ILE (metástasis, recidiva), supervivencia global (SG) y evento SG (si ocurrió muerte o no).

Las muestras fueron tomadas por adjuntos y/o residentes del postgrado de Cirugía Oncológica del Instituto de Oncología “Dr. Miguel Pérez Carreño”, Valencia, y remitidas al Servicio de Anatomía Patológica de dicho instituto. En las piezas de vaciamiento axilar en fresco se seleccionaron ganglios linfáticos seccionados siguiendo el eje mayor, una mitad se colocó en formol para su procesamiento histológico de rutina, la otra mitad en un tubo plástico eppendorf para su congelación a  $-70^{\circ}\text{C}$  rotuladas y almacenadas en nitrógeno líquido y usadas luego para RT-PCR con *MAGE A* y *MMG*.

Estudio por RT-PCR:

Extracción del ARN de muestras en fresco, utilizándose el Kit *RNAagents total RNA isolation system*, siguiendo las indicaciones del fabricante. Se empleó 50 mg de tejido en tubo estéril y se adicionó 600 ul de solución desnaturalizante y se homogenizó por agitación en vortex 15-30 seg, luego se adicionó 60 ul Acetato de Sodio 2M (pH: 4.0), mezclado por inversión del tubo 4 -5 veces. Se agregaron 600 ul Fenol Cloroformo Alcohol Isoamílico, mezcla por inversión 3 – 5 veces,  $4^{\circ}\text{C}$  por 20 min. centrifugado a  $13.500\times g$  por 20 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , adición de 400ul de isopropanol en tubo nuevo y transferencia de la fase acuosa que contiene el ARN a tubo estéril con cuidado de no tocar la fase orgánica y la interfase, y se procedió a precipitar el ARN con 600 ul de isopropanol. Se adicionó igual volumen de isopropanol, mezcla por inversión, 6 veces, incubado a  $4^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos y centrifugados a  $13.500\times g$  por 20 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Al precipitar el ARN, se descartó el sobrenadante y se procedió a lavar el sedimento, el pellet, adicionándole 1 ml de etanol frío al 75% y centrifugando a  $13.500\times g$  por 20 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Secado del pellet al aire por 5 -20 min, resuspensión del ARN en 30 ul de agua libre de nucleasas rehidratando a  $4^{\circ}\text{C}$  por tiempo mayor a tres horas, en ocasiones por toda la noche.

Fue utilizada la técnica tradicional de RT- PCR para el estudio por biología molecular de la expresión de los marcadores *MMG* y *MAGE-A3*. Se valoró la integridad de ADNc sintetizado (co-

retrotranscrito amplificando el gen de la GAPDH). Se utilizaron controles de reactivos sin ARNm y con ARNm negativo y positivo. Se preparó la mezcla para la RT-PCR (H<sub>2</sub>O libre de nucleasas, buffer AMV/Tfl 5x, primers, Inhibidor de ARNasa, enzimas AMV/Tfl, dNTP, Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, DTT) y se agregaron 49ul de la mezcla mas 1ul de ARN a cada tubo. Los primers utilizados fueron MMG y MAGE-A3. La PCR fue realizada en un termociclador (PTC 100 de M.J.-Research), en un volumen de reacción de 50  $\mu$ l. Cada mezcla de reacción fue sujeta a 30 ciclos de amplificación de 95°C por 30 seg., 62°C por 15 seg., 72°C por 20 seg, se culminó la reacción a 72 oC por 7min. Para la electroforesis, los productos de PCR obtenidos fueron evaluados en un gel de agarosa y corridos a 100V por 90 minutos y visualizadas con luz ultravioleta las bandas amplificadas con fotodocumentación de los resultados. Gel de agarosa 2% (tris borato EDTA 1X pH:8 y bromuro de etidio 0,5ug/ml). La muestra con 2  $\mu$ l buffer de carga (0,25% Azul de bromofenol, 0,25% Xilene Cyanol FF, 30% glicerol en H<sub>2</sub>O) y 10  $\mu$ l de la mezcla de PCR.

Para el análisis de los datos se utilizó el programa estadístico SPSS versión 18 para Windows 2007. Las variables fueron expresadas en frecuencias absolutas y relativas, los resultados fueron presentados en tablas y gráficos, mientras que las pruebas de asociación se realizaron mediante el test chi cuadrado ( $X^2$ ). Se consideró significativo  $P < 0,05$ .

## RESULTADOS

Fueron evaluadas 125 pacientes con edades entre 30 y 85 años ( $51,16 \pm 12,80$  años). Tomando como punto de división 50, la muestra se distribuyó equitativamente por encima y por debajo de dicho valor (tabla 1); el mayor porcentaje de las mismas no llegaban a los 50 años.

**Tabla 1.** Distribución de la muestra estudiada según grupo etario.

Grupo etario (años)	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa (%)
$\leq 50$	67	53,8
$\geq 50$	58	46,2
Total	125	100

La distribución de las pacientes según la característica morfológica el tamaño del tumor en la muestra en estudio se presenta en la tabla 2, alrededor de un 40% de las mujeres evaluadas presentaban un tamaño de tumor mayor a los 5 cm, siendo el grupo más frecuente; a la vez se encontró una baja proporción de pacientes con tamaños menores a los 2 cm (tabla 2) y más de la mitad (53%) presentó un grado histológico II (tabla 3).

**Tabla 2.** Distribución de la muestra estudiada según el tamaño del tumor.

Tamaño del tumor	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa (%)
T1 < 2 cm	10	8,4
T2 2 – 5 cm	32	25,3
T3 < 5 cm	50	39,8
T4 Extensión pared o piel	43	26,5
<b>Total</b>	<b>125</b>	<b>100</b>

**Tabla 3.** Distribución de la muestra estudiada según el grado histológico del tumor.

Grado Histológico	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa (%)
I	26	21,0
II	66	53,1
III	33	25,9
<b>Total</b>	<b>125</b>	<b>100</b>

La frecuencia en cuanto a la positividad, expresión de los marcadores evaluados, se muestra en la tabla 4, observándose porcentajes de 48% y 55% pacientes positivos para MAGE A3 y mamoglobina, respectivamente.

**Tabla 4.** Positividad de los marcadores tumorales estudiados.

Resultado	MAGE A3		Mamoglobina	
	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa (%)	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa (%)
Positivo	60	48,0	69	55,2
Negativo	65	52,0	56	44,8
<b>Total</b>	<b>125</b>	<b>100</b>	<b>125</b>	<b>100</b>

La evaluación de ambos marcadores en las pacientes estudiadas se muestra en la tabla 5.

**Tabla 5.** Asociación de la positividad entre los marcadores tumorales estudiados.

MAGE A3 n(%)	Mamoglobina n(%)		Total
	Negativo	Positivo	
Negativo	46 (36,8)	14 (11,2)	60 (48)
Positivo	23 (18,4)	42 (33,6)	65 (52)
<b>Total</b>	<b>69 (55,2)</b>	<b>56 (44,8)</b>	<b>125 (100)</b>

Aproximadamente 37% de las pacientes en estudio resultaron negativas para ambos marcadores tumorales, mientras que 34% coincidió en la positividad de ambos parámetros, un

bajo porcentaje de pacientes fueron sólo positivo en una de ambas pruebas (tabla 5). Aplicando la prueba de chi cuadrado, se obtuvo un valor de chi-cuadrado = 21,501 y un valor de  $p = 0.0001$ , razón por la cual se concluye que existe una asociación estadísticamente significativa entre la positividad o negatividad de las pacientes en el resultado de la prueba de MAGE A3 y MMG, con un 95% de confianza.

**Tabla 6.** Distribución de casos según análisis histológico con HE de los ganglios linfáticos axilares (GLA) y expresión de MAGE A3 y MMG. n(%)

MARCADOR	Análisis histológico GLA			
	125 (100)			
	GLA - 44 (35,2)		GLA+ 81 (64,8)	
	RT-PCR -	RT-PCR +	RT-PCR -	RT-PCR +
MMG	30 (68,18)	14 (31,82)	39 (48,15)	42 (51,81)
MAGE A3	29 (65,91)	15 (34,09)	30 (37,03)	51 (62,96)

Se evaluaron ganglios linfáticos axilares de 125 pacientes con cáncer de mama, 44 pacientes con ganglios linfáticos axilares negativos al estudio histológico convencional con hematoxilina y eosina (GLA-) y 81 con metástasis documentadas (GLA+) por el mismo estudio histológico. En las pacientes con GLA positivos se observó una mayor frecuencia de los marcadores tumorales positivos, en comparación con las pacientes con GLA negativos (tabla 6). La expresión MMG fue en 50% de ganglios con metástasis histológicamente demostrada y 31,82% sin evidencia histológica de metástasis; MAGE-A3 se expresó en 58% de ganglios linfáticos axilares metastásicos y 36% en ganglios linfáticos axilares sin metástasis.

Aplicando la prueba de chi cuadrado para evaluar la relación entre la positividad o no de los marcadores con la positividad en los ganglios axilares, se obtuvo un valor de chi-cuadrado = 4,63 y un valor de  $p = 0.0315$  para el caso de mamoglobina, y un valor de chi-cuadrado = 9.54 y un valor de  $p = 0.0020$  para el caso de MAGE A3, lo que indica una asociación estadísticamente significativa entre la positividad del marcador y la positividad en la prueba de hematoxilina eosina, con un 95% de confianza.

Se realizó una asociación entre los resultados de la prueba de MAGE A3 y el tamaño del tumor, resultados que se muestran en la tabla 7. Es notable que a medida que es mayor el tamaño del tumor, aumenta la positividad de la prueba de MAGE A3 hasta la medida > 5 cm y solo hubo un caso MAGEA A3 positivo en los tumores menores de 2 cm. Sin embargo, a pesar

de la tendencia observada, aplicando la prueba de asociación, se obtuvo un valor de  $\chi^2=6,523$  y un valor de  $p=0,089$ , lo que indica que, al 95% de confianza, no existe asociación estadísticamente significativa entre el tamaño del tumor y la positividad (expresión) de MAGE A3

**Tabla 7.** Asociación entre los resultados obtenidos en la prueba de MAGE A3 y el tamaño del tumor.

Tamaño del tumor n(%)	Mage A3 n(%)		Total
	Negativo	Positivo	
T1 < 2 cm	6 (7,2)	1 (1,2)	7 (8,4)
T2 2 – 5 cm	11 (13,3)	10 (12,0)	21 (25,3)
T3 < 5 cm	15 (18,1)	18 (21,7)	33 (39,8)
T4 Extensión pared o piel	7 (8,4)	15 (18,1)	22 (26,5)
Total	39 (47,0)	44 (53,8)	83 (100)

En lo que respecta a la prueba de MMG, la asociación de la misma con el tamaño del tumor, se encuentra en la tabla 8. Igual que en MAGE A3 y su asociación con el tamaño del tumor, a medida que aumenta el tamaño del tumor, aumenta la positividad de la prueba de MMG (tabla 8), y en este caso, aplicando la prueba de asociación, se obtuvo un valor de  $\chi^2=9,484$  y un valor de  $p=0,024$ , lo que indica que, al 95% de confianza, existe asociación estadísticamente significativa entre el tamaño del tumor y la positividad o no de la prueba de la MMG.

**Tabla 8.** Asociación entre los resultados obtenidos en la prueba de MMG y el tamaño del tumor.

Tamaño del tumor n(%)	Mamoglobina n(%)		Total
	Negativo	Positivo	
T1 < 2 cm	6 (7,2)	1 (1,2)	7 (8,4)
T2 2 – 5 cm	13 (15,7)	8 (9,6)	21 (25,3)
T3 < 5 cm	18 (21,7)	15 (18,1)	33 (39,8)
T4 Extensión pared/piel	6 (7,2)	16 (19,3)	22 (26,5)
Total	43 (51,8)	40 (48,2)	83 (100)

**Tabla 9.** Intervalo libre de enfermedad y tamaño del tumor de mama en pacientes GLA+/- y con expresión o no expresión simultánea de los marcadores MMG y MAGE-A3 por RT-PCR

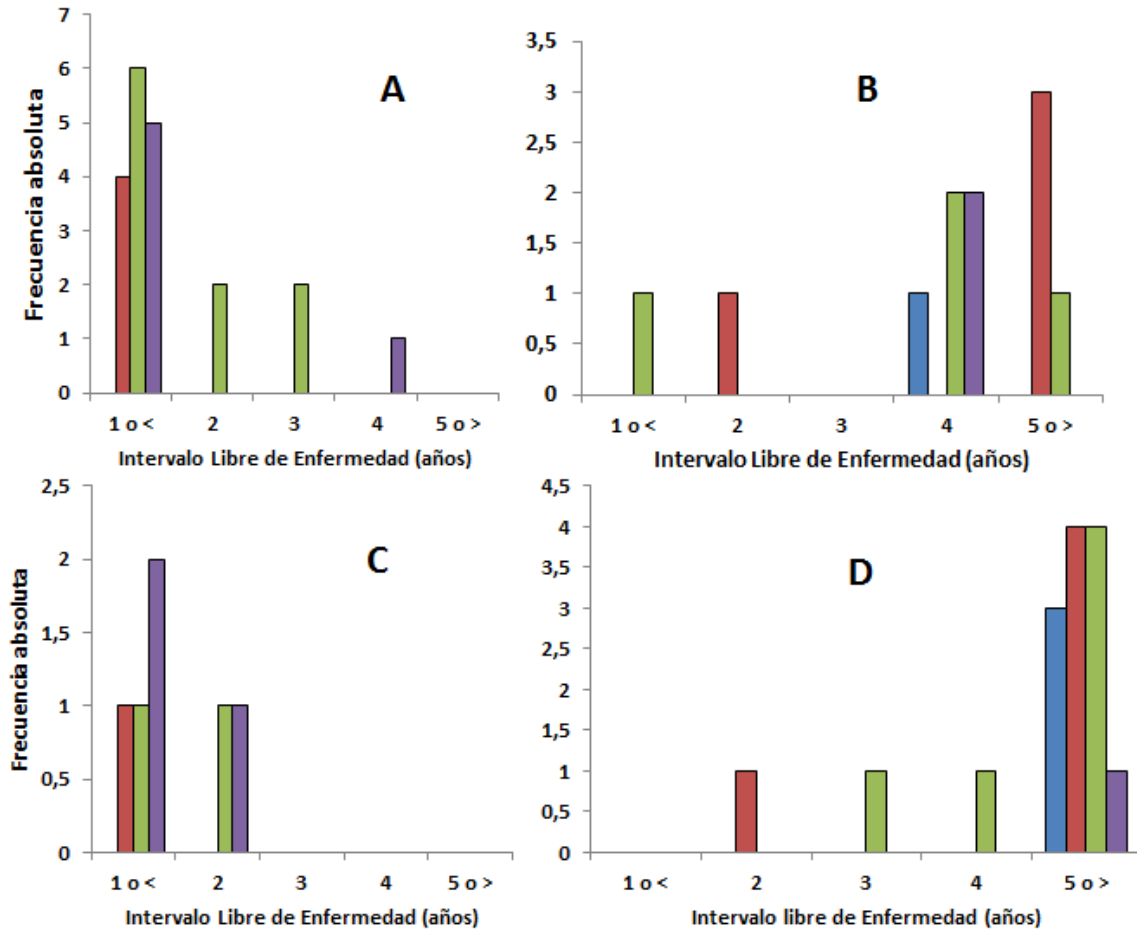
GLA	T*	MAGE/MMG	INTERVALO LIBRE DE ENFERMEDAD (años)					TOTAL
			1o<	2	3	4	5 o>	
+	1*	++						0
+	2	++	4					4
+	3	++	6	2	2			10
+	4	++	5			1		6
total			15	2	2	1		20
+	1	--				1		1 (100)
+	2	--		1*			3	4 (100)
+	3	--	1			2	1	4 (100)
+	4	--				2		2 (100)
total			1	1		5	4	11
-	1	++						
-	2	++	1					1 (100)
-	3	++	1	1				2 (100)
-	4	++	2	1				3 (100)
total			4	2				6
-	1	--					3	3 (100)
-	2	--		1**			4	5 (100)
-	3	--			1	1	4	7 (100)
-	4	--					1	1 (100)
total				0	1	1	12	15

T\* tamaño del tumor de mama

1\* (<2cm), 2 (2,1 a 5cm), 3 (>5cm), 4 (Tumor de cualquier tamaño con extensión directa a la pared torácica o piel) ++ presencia simultánea de MMG y MAGE-A3

n(%) \*\* caso Triple negativo \*sobrevida global de 4 años

Al comparar la expresión simultánea de MMG Y MAGE A3 y el tamaño del tumor primario (T1, T2, T3, T4), con el ILE se evidenció el mayor porcentaje de expresión en los pacientes con mayor tamaño del tumor pero además se encontró la tendencia evidente que el intervalo libre de enfermedad disminuye marcadamente al estar presente simultáneamente ambos marcadores independientemente del tamaño del tumor (tabla 9 y figura 1).



**Figura 1.** Representación gráfica del Intervalo libre de enfermedad y tamaño del tumor de mama en pacientes GLA+/- y con no expresión o expresión simultánea de los marcadores, MMG y MAGE-A3 por RT-PCR. El tamaño del tumor está clasificado como tamaño 1 (■), tamaño 2 (■), tamaño 3 (■) y tamaño 4 (■). El grupo de pacientes con ganglios linfáticos positivos está clasificado en aquellos con la expresión de ambos marcadores tumorales (A) y aquellos sin expresión de marcadores (B). El grupo de pacientes con ganglios linfáticos negativos, está clasificado igualmente en aquellos con la expresión de ambos marcadores tumorales (C) y aquellos sin expresión de marcadores (D).

Fue evaluada la relación existente entre la prueba de MAGE A3 y el grado histológico del tumor, tabla 10.

**Tabla 10.** Asociación entre los resultados obtenidos en la prueba de MAGE A3 y el grado histológico del tumor.

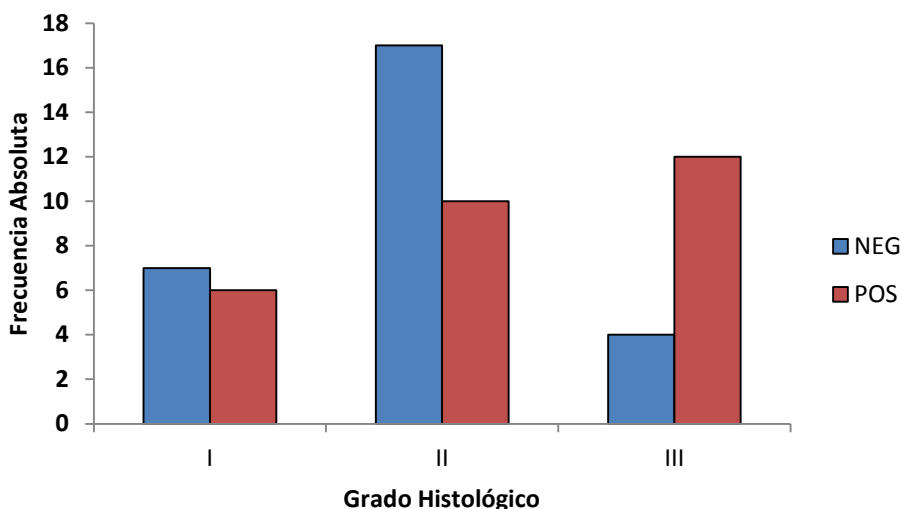
Grado Histológico n(%)	MAGE A3 n(%)		Total
	Negativo	Positivo	
I	9 (11,1)	8 (9,9)	17 (21,0)
II	24 (29,6)	19 (23,4)	43 (53,0)
III	6 (7,4)	15 (18,6)	21 (26,0)
Total	39 (48,1)	42 (51,9)	81 (100)

El grado histológico menor es el que posee el menor número de casos positivos a la prueba de MAGE A3, en comparación con los grados II y III donde están ubicadas la mayoría de las pacientes con expresión del marcador, sin embargo no se observa una relación clara entre estas dos variables, de hecho, la prueba de asociación arrojó un valor de chi-cuadrado=4.39 y un valor de  $p=0.1112$ , lo que indica que no hay asociación estadísticamente significativa entre la positividad de la prueba de MAGE A3 y el grado histológico del tumor, igual que en lo que respecta a la asociación de la expresión de MMG en asociación con el grado histológico del tumor, (tabla 11), en la que no se obtuvo asociación estadísticamente significativa entre la positividad de la prueba de MMG y el grado histológico del tumor (chi-cuadrado=4,17;  $p=0.1243$ ).

**Tabla 11.** Asociación entre los resultados obtenidos en la prueba de Mamaglobina y el grado histológico del tumor.

Grado Histológico n(%)	Mamoglobina n(%)		Total
	Negativo	Positivo	
I	9 (11,1)	8 (9,9)	17 (21,0)
II	26 (32,1)	17 (20,9)	43 (53,0)
III	7 (8,6)	14 (17,3)	21 (26,0)
Total	42 (51,9)	39 (48,1)	81 (100)

Fue evaluada la relación existente entre la prueba de MAGE A3 y el estadio clínico de la enfermedad (tabla 12).



**Figura 2.** Representación gráfica de la relación entre la positividad o no de ambos marcadores con el grado histológico del tumor en el cual se muestran los casos positivos (■) y negativos (■) a las pruebas de los macadores tumorales MAGE A3 y MMG.



**Tabla 12.** Intervalo libre de enfermedad y grado histológico del tumor de mama en pacientes GLA+/- y con no expresión o expresión simultánea de los marcadores, MMG y MAGE-A3 por RT-PCR

GLA	GH*	MAGE/MMG	INTERVALO LIBRE DE ENFERMEDAD (años)					TOTAL
			1o<	2	3	4	5 o>	
+	1	++	4		1			5
+	2	++	5		1	1	1	8
+	3	++	3	5				8
total			12	5	2	1	1	21
+	1	--				1	1	2
+	2	--	1	2		2	1	6
+	3	--						0
total			1	2		3	2	8
-	1	++		1				1
-	2	++		1				1
-	3	++	4					4
total			4	2				6
-	1	--				1	2	3
-	2	--			3	1	4	8
-	3	--				1	2	3
total					3	3	8	14

GH\*: grado histológico del tumor de mama  
n(%)

Fue aplicada la prueba de chi cuadrado para evaluar la relación existente entre la positividad o no de ambos marcadores con el grado histológico del tumor se observó asociación estadísticamente significativa (chi-cuadrado =5.89; p=0.0526), observándose que a mayor grado histológico mayor es la expresión de ambos marcadores. De la misma forma, se obtuvieron resultados similares al relacionar la expresión de MMG y MAGE A3 con el tamaño del tumor (chi-cuadrado=7.92; p=0.0191)

**Tabla 13.** Asociación entre los resultados obtenidos en la prueba de MAGE A3 y el estadio clínico de la enfermedad.

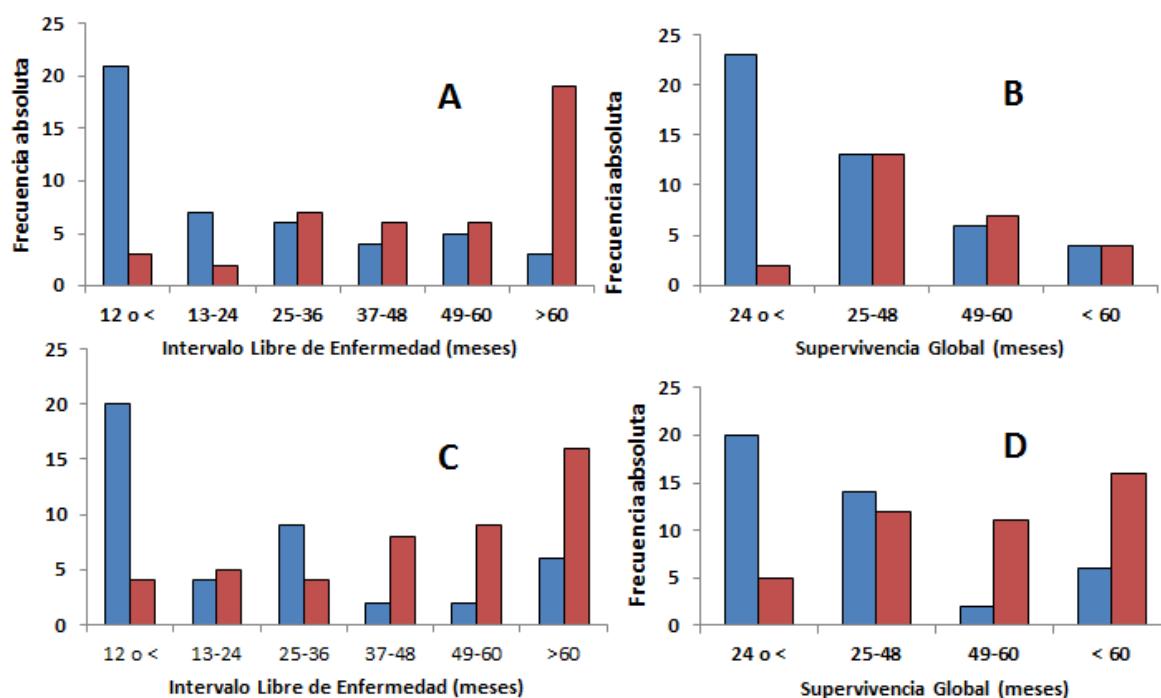
Estadio clínico de la enfermedad n(%)	MAGE A3 n(%)		Total
	Negativo	Positivo	
I	4 (4,4)	1	5 (5,6)
II	24	16	40 (44,4)
III	20 (22,2)	23 (25,6)	43 (47,8)
IV	0 (0,0)	2 (2,2)	2 (2,2)
Total	48	42	90 (100)

En las pacientes con estadio clínico I solo hubo expresión de MAGE A3 en 1 de 4 pacientes diagnosticadas como estadio I, mientras que se expresó en aproximadamente mitad, o más de la mitad de las pacientes diagnosticadas como estadio clínico II y III (16 de 40 y 23 de 43 respectivamente) y en todas las pacientes en estadio IV (tabla 13)

**Tabla 14.** Asociación entre los resultados obtenidos en la prueba de Mamoglobina y el estadio clínico de la enfermedad.

Estadio clínico de la enfermedad n(%)	Mamoglobina n(%)		Total
	Negativo	Positivo	
I	5 (5,6)	0 (0,0)	5 (5,6)
II	20 (22,2)	20 (22,2)	40 (44,4)
III	18 (20,0)	25 (27,8)	43 (47,8)
IV	0 (0,0)	2 (2,2)	2 (2,2)
Total	43	47	90 (100)

Similar a MAGE A-3, en las pacientes con estadio clínico I no hubo expresión de MMG, mientras que se expresó en la mitad o más de la mitad de las pacientes diagnosticadas como estadio clínico II y III y en todas las pacientes en estadio IV (tabla 14), a pesar de lo descrito no se obtuvo asociación estadísticamente significativa entre el estadio clínico de la enfermedad y la positividad del marcador tumoral MAGE A3 (chi-cuadrado=2.86; p=0.0910) y MMG (chi-cuadrado=2.18; p=0.1396).



**Figura 3.** Representación gráfica del Intervalo libre de enfermedad y supervivencia global (SG), en el cual se muestran los casos positivos (■) y negativos (■) a MAGE A3 (A y B) y MMG (C y D).

Al comparar la presencia de MAGE A o MMG con el ILE y la SG, en ambos caso la mayor proporción de casos se ubican en el menor tiempo de evolución al estar presente cualquiera de los marcadores y cuando no el marcador no se expresó los casos presentaron mayor tiempo de evolución libre de enfermedad y de SG. Se obtuvo asociación estadísticamente significativa en la positividad de la prueba de MAGE A3 y el ILE (chi-cuadrado=25.11; p=0.000); así como con la prueba de MMG y el ILE (chi-cuadrado=15.54; p=0.0004). Al asociar la supervivencia global con la positividad de los marcadores, tan sólo se obtuvo asociación estadísticamente significativa con el marcador MMG (chi-cuadrado=19.43; p=0.0001).

## DISCUSIÓN

Los carcinomas de mama representan un grupo de tumores que muestra un comportamiento biológico muy diverso y una gran variabilidad clínica. La clasificación histológica actual de los carcinomas de mama no refleja la heterogeneidad de los tumores en su comportamiento biológico ni permite identificar los pacientes que presentarán mejores respuestas y beneficios con las diferentes modalidades terapéuticas. (45) De ahí el interés de investigar marcadores tumorales eficaces en la detección precoz, con fines pronósticos, que evalúen la respuesta terapéutica, o que detecten recidivas.

Este estudio demostró la expresión de MMG en solo 51% de 81 ganglios linfáticos con metástasis histológicamente documentadas, (GLA+) porcentaje inferior al 91 % obtenido por Watson en 11 pacientes, por Marchetti en el 97% de los ganglios linfáticos histológicamente comprometidos, y de Aihara et al, que en 1999, detectaron MMG en el 100 % de 11 pacientes con ganglios linfáticos axilares metastásicos. (46, 47, 49) Sin embargo, Bhargava, 2007, comparó la sensibilidad y la especificidad de un cóctel de anticuerpos de anti-mamaglobina GCDFP-15 en una serie de 29 carcinomas de mama con metástasis de ganglios linfáticos (en secciones enteras del tejido) y 63 carcinomas de mama. Los autores reportaron positividad de la mamaglobina en 67 de 121 (55%) carcinomas de mama, resultados si comparables a los obtenidos en esta investigación. (48)

El porcentaje de casos positivos para MMG de este estudio es similar al alcanzado por Bhargava quien estudió zonas extensas de ganglios linfáticos metastásicos (GLA+) y en el tumor primario, pero inferior a lo reportado por otros autores, tanto en tumor primario como en GLA+; la razón de estas diferencias pudiera estar asociada a la heterogeneidad que caracteriza al cáncer de mama y/o a la zona del tejido ganglionar seleccionado, en esta investigación se

estudiaron sólo zonas de un ganglio protocolo y no la totalidad de la muestra para no comprometer el diagnóstico histológico. (48)

Encontramos que se expresaron ambos marcadores en más del 50% de los GLA y que la presencia de MMG y MAGE-A3 se mantuvo en la proporción esperada en los que se encuentra mayor porcentaje de expresión de MAGE-A3 con respecto a MMG. Hubo expresión de MMG en 31% pacientes con ganglios linfáticos histológicamente negativos; (14 de 44) el porcentaje es similar a Marchetti (2001) y Aihara (1999) quienes obtuvieron expresión de MMG en 31% (11 de 45) y 29% (46 de 159) de ganglios linfáticos negativo a la histología. (46,47)

La expresión de MAGE-A3 en GLA+ fue 62% de 81 pacientes, esta expresión es superior al 19 % y 21% encontrado por Kown en ganglios linfáticos, e inferior a estudios en los que se empleó tejido mamario tumoral primario, como Taback et al., que en 25 pacientes estudiados obtuvieron expresión de MAGE-A3 en el 100 %, la variabilidad de expresión pudo estar relacionada con la menor cantidad de tejido analizado. (50) La positividad del MAGE-A3 en GLA- fue 36 %, (16 de 44), se corresponde con hallazgos de Washer et al., que obtuvieron expresión de este marcador en 38 % de pacientes GLA-. Estos resultados sugieren que MMG y MAGE-A3 podrían ser marcadores de metástasis axilares de mama en ganglios axilares negativos al estudio histológico. (51)

El tamaño del tumor es un factor pronóstico importante ya que tiene una asociación directa con la sobrevida y el estado ganglionar en la paciente (2), en la correlación entre la expresión de MAGE A3 y el tamaño del tumor, (tabla 7), se encontró que a medida que es mayor el tamaño del tumor, es mayor el porcentaje de pacientes que expresan este marcador. MAGE A3 estuvo presente en la mitad de los pacientes con tumores T2 (10 de 21) y en más de la mitad de los pacientes con tumores T3 y T4 (18 de 33 y 15 de 22 respectivamente), en oposición solo 1 de 7 de los pacientes con tamaño T1 expresó el marcador. Cuando se discriminó la relación entre el tamaño del tumor y la positividad de MAGE A3 por GLA- y GLA+ se mantuvo la misma tendencia. Y cuando se relacionó la presencia simultánea de los marcadores MMG y MAGE A3 con el tamaño del tumor en los GLA+ ambos marcadores se expresaron a la vez en más de la mitad de los pacientes con el mayor tamaño del tumor, (T3), y no se expresaron en paciente con el menor tamaño del tumor (T1). Se mantiene similar proporción de ambos marcadores en GLA-, ambos marcadores se expresaron paralelamente en la mitad de pacientes con mayor tamaño del tumor (T2 y T3) y no hubo positividad simultánea de los marcadores en los pacientes con el menor tamaño del tumor (T1).

Al comparar la expresión simultánea de MMG Y MAGE A3 y el tamaño del tumor primario (T1, T2, T3, T4), con el ILE se evidenció el mayor porcentaje de expresión en los pacientes con mayor tamaño del tumor pero además se encontró que el estar presente simultáneamente ambos marcadores se relacionó con un menor intervalo libre de enfermedad independientemente del tamaño del tumor (tabla 9). El incremento del tamaño del tumor primario se asocia con un aumento en la mortalidad por cáncer de mama, es un hecho conocido que el tamaño tumoral es un factor pronóstico del comportamiento de esta enfermedad (52), pero aunque en la investigación la expresión de los marcadores se asoció a tumores de mayor tamaño, encontramos como su positividad simultánea pronostica una evolución menos favorable independientemente del tamaño del tumor y que la ausencia simultánea de MMG y MAGE A- predice un curso menos agresivo de la enfermedad tendencia que se observa tanto en GLA+ como en GLA-.

La presencia concurrente de ambos marcadores independiente del tamaño del tumor primario infiere una mayor agresividad del cáncer evidenciada por disminución del ILE, lo que pudiese extrapolarse como pronóstico del comportamiento de esta enfermedad y ser explicado en GLA- por el diagnóstico de micrometástasis no encontradas, la presencia de micrometástasis e incluso de CTA se asocia con una reducción del intervalo libre de enfermedad (53, 54) habrá que dilucidar con los resultados de IHQ la presencia de enfermedad en GLA- que al contrastar con esta expresión simultánea de MAGE A- y MMG esta expresión pueda ser predictiva de evolución.

Núñez y colaboradores en tumores primarios de cáncer de mama de 128 pacientes encontraron que la expresión de MMG reflejó un fenotipo tumoral menos agresivo, mientras que en el presente estudio la expresión de MMG vinculado al MAGE A3 parece indicar mayor agresividad en la enfermedad. (19) En este trabajo pareciera que la tendencia es que la presencia de solo MMG se correspondiese con un comportamiento algo menos agresivo de la enfermedad, diferente esto a la positividad de MAGE A3, pero es evidente y significativo que al estar expresado simultáneamente MMG con MAGE-A3 cambia el comportamiento prediciendo esta sinergia un curso más agresivo de la enfermedad. Al comparar la presencia de MAGE A o MMG con el ILE y la SG, en ambos caso la mayor proporción de casos se ubican en el menor tiempo de evolución al estar presente cualquiera de los marcadores y cuando no el marcador no se expresó los casos presentaron mayor tiempo de evolución libre de enfermedad y de SG (figura 3).

El grado histológico es un factor pronóstico importante que ha mostrado tener valor para predecir la supervivencia en pacientes con cáncer de glándula mamaria. El alto grado histológico se relaciona con mayor frecuencia a metástasis, recurrencias tumorales, muerte por enfermedad metastásica, menor intervalo libre de enfermedad y supervivencia global más corta (2, 54), en esta investigación se encontró que la expresión de los marcadores fue mayor en los pacientes con mayor grado histológico, GH3, en la relación entre la expresión simultánea de estos marcadores y el grado histológico del tumor primario, (figura 2). Aunque está establecido que los pacientes con menor grado histológico tienen mejor pronóstico cuando se compararon los pacientes con GH1 que presentaron la expresión de ambos marcadores, estos pacientes que se consideran de mejor evolución contradictoriamente presentaron un ILE mucho menor a lo esperado de acuerdo a su GH, de igual manera se observó que ambos marcadores MMG y MAGE A3 eran positivos tanto en los pacientes con GLA+ como en los pacientes con GLA- y en ambos se visualiza esa tendencia que en presencia simultánea de MMG y MAGE A3 disminuía el intervalo libre de enfermedad independientemente del GH del tumor primario (tabla 12).

El grado histológico es reconocido como un factor pronóstico clásico, que ha ganado aceptación como un indicador de la agresividad tumoral y se ha demostrado la importancia de su determinación en pacientes con pequeños carcinomas, Joensuu et al, evaluaron 265 casos y la supervivencia causa-específica, a los 20 años la supervivencia para los T1a y T1b fue del 81%; sin embargo, ninguna de las pacientes con tumores bien diferenciados, GH1, murió de cáncer de mama. En este trabajo los pacientes con GH1, T1 en los cuales fuesen expresados de manera simultánea ambos marcadores, MMG y MAGE-A3 se encontró un intervalo libre de enfermedad generalmente de 1 año o menor y en aquellos pacientes GH1, T1 en los que no hubo presencia de ninguno de marcadores el ILE fue mayor de 5 años para la mayoría de estos pacientes. Esto de manera superponible tanto en pacientes GLA+ como en pacientes GLA- . (56)

El presente estudio ha demostrado que la expresión de los marcadores moleculares MMG y MAGEA3, a través del ensayo RT-PCR, es útil en la detección de enfermedad en ganglios histológicamente negativos y que al expresarse simultáneamente independientemente del tamaño del tumor y del grado histológico del tumor primario pronostican un intervalo libre de enfermedad menor derivando en una mayor agresividad de la enfermedad, prediciendo una peor evolución.

Sin embargo se desconoce el valor pronóstico de la detección de CTA (por PCR o inmunohistoquímica) en GLA histológicamente negativos y son necesarios estudios prospectivos

que ayuden a identificar pacientes con mayor riesgo de recurrencia y/o metástasis quienes podrían beneficiarse con una terapia adyuvante más agresiva. De igual manera, está por determinarse cuál es el marcador o panel de marcadores que deba ser utilizado. Mientras y debido a la heterogeneidad del cáncer de mama, parece sensato recomendar el uso de varios marcadores.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) MSDS. Incidencia del cáncer de mama. [Datos en línea]. Disponible: [www.msds.gov.ve/msds/modules](http://www.msds.gov.ve/msds/modules). [Consulta: 2006 julio 18]. Anuario de mortalidad del Ministerio del Poder Popular para la Salud, 2003
- (2) Pérez, Víctor, Vela Chavez T., Tiscareño A., Diagnóstico Histopatológico y Factores Pronóstico en Cáncer Infiltrante de Glándula Mamaria, *Cancerología* 3 (2008): 7-17
- (3) Noguchi M. Therapeutic relevance of breast cancer micrometastases in sentinel lymph nodes. *Br J Surg.* 2002; 89:1505-15
- (4) Jung YS, Lee KJ, Kim HJ, Yim HE, Park JS, Soh EY, Kim MW, Park HB. Clinical significance of bone marrow micrometastasis detected by nested rt-PCR for keratin-19 in breast cancer patients. *JpnJClinOncol.* 2003; 33:167-72
- (5) Ferrucci PF, Rabascio C, Mazzetta C, Cocorocchio E, Agazzi A, Vanazzi A, Cinieri S, Peccatori FA, Paolucci M, Bertolini F, Martinelli G. Mammaglobin expression in leukapheresis products is a predictive marker of poor prognosis in women with high-risk breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2004;10:6039-46.
- (6) Alfred D C, Elledge RM. Caution concerning micrometastasis breast carcinoma in sentinel lymph nodes. *Cancer* 1999;86:905-754)
- (7) Cserni, 2002, Cserni G. Complete serial sectioning of axillary sentinel lymph nodes in patients with breast. Analysis of two different step sectioning and immunohistochemistry protocols in 246 patients. *J Clin Pathol* 2002
- (8) Cordoba, A., Ederra, M., Amat, I. et al. Ganglio centinela en cáncer de mama: Estudio histológico de 67 casos. *Anales Sis San Navarra.* [online]. 2004, vol. 27, no. 2 [citado 2008-04-20], pp. 191-200. Disponible en: <[http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S113766272004000300004&lng=es&nrm=iso](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S113766272004000300004&lng=es&nrm=iso)>. ISSN 1137-6627
- (9) Cohen C, Alazraki N, Styblo T, Waldrop SM, Grant SF, Larsen T. Immunohistochemical evaluation of sentinel lymph nodes in breast carcinoma patients. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2002; 10: 296-303
- (10) Weaver DL. Sentinel lymph nodes and breast carcinoma. Which micrometastases are clinically significant? *Am J Surg Pathol* 2003; 27: 842-845
- (11) Ishida M, Kitamura K, Kinoshita J, Sasaki M, Kuwahara H, Sugimachi K. Detection of micrometastasis in the sentinel lymph nodes in breast cancer. *Surgery.* 2002; 131(Suppl):S211-6.
- (12) Pierga JY, Deneux L, Bonneton C, Vincent-Salomon A, Nos C, Anract P, Magdelenat H, Pouillart P, Thierry JP. Prognostic value of cytokeratin 19 fragment (CYFRA 21-1) and cytokeratin-positive cells in bone marrow samples of breast cancer patients. *Int J Biol Markers.* 2004;19:23-31.
- (13) Bozionellou V, Mavroudis D, Perraki M, Papadopoulos S, Apostolaki S, Stathopoulos E, Stathopoulou A, Lianidou E, Georgoulas V. Trastuzumab administration can effectively target chemotherapy-resistant cytokeratin-19 messenger RNA-positive tumor cells in the



- peripheral blood and bone marrow of patients with breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2004; 10:8185-94.
- (14) Rampaul RS, Miremedi A, Pinder SE, Lee A, Ellis IO. Pathological validation and significance of micrometastasis in sentinel nodes in primary breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2001; 3:113-6.
- (15) Lockett MA, Baron PL, O'Brien PH; Elliot BM, Robison JG, Maitre N, Metcalf JS, Cole DJ. Detection of occult breast cancer micrometastases in axillary lymph nodes using a multimarker reverse transcriptase-polymerase chain reaction panel. *J Am Coll Surg* 1998; 187: 9-16.
- (16) Ozbas S, Dafydd H, Purushotham AD. Bone marrow micrometastasis in breast cancer. *Br J Surg* 2003; 90:290-301
- (17) Piñero, A., Jiménez, J., Merck, B., Vázquez C., y Grupo de Expertos. Reunión de consenso sobre la biopsia selectiva del ganglio centinela en el cáncer de mama. Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria\* *Rev Esp Patol DOCUMENTO DE CONSENSO* 2007; Vol. 40, n.º 2: 91-95
- (18) Lyman GH. ASCO Guideline Recommendations for Sentinel Lymph Node Biopsy in Early-Stage Breast Cancer *J Clin Oncol* 2005; 23:7703-20.
- (19) Nunez-Villar MJ, Martinez-Arribas F, Pollan M, Lucas AR, Sanchez J, Tejerina A, Schneider J. Elevated mammaglobin (h-MAM) expression in breast cancer is associated with clinical and biological features defining a less aggressive tumour phenotype. *Breast Cancer Res.* 2003; 5:R65-70.
- (20) Bitisik O, Saip P , Saglam S, Derin, Dalay N, Mammaglobin and maspin transcripts in blood may reflect disease progression and the effect of therapy in breast cancer *Genet.Mol.Res.*9 (1):97-106. 2010  
Disponible en: <http://www.geneticsmr.com/year2010/vol9-1/pdf/gmr649.pdf>
- (21) Huo, L. Zhang, J., Gilcrease, MZ, Gong, Y. Wu, Y. Zhang, H., Resetkova, E. Hunt, KK y Deavers, MT, Gross cystic disease fluid protein-15 and mammaglobin A expression determined by immunohistochemistry is of limited utility in triple-negative breast cancer. *Histopatología.* doi: 10.1111/j.1365-2559. 2012. 04344.x
- (22) Washer RA, Bostick PJ, Huynh KT, Tuner R, Giuliano AE, Hoon DSB. Detection of MAGE-A3 in breast cancer patients sentinel lymph nodes. *Br J Cancer* 2001; 9:1340-6.
- (23) Badovinac Črnjević T, Spagnoli G, Juretić A, Jakić-Razumović J, Podolski P, Šarić N. High expression of MAGE-A10 cancer-testis antigen in triple-negative breast cancer. *Med Oncol.* 2012 Sep;29(3):1586-91. doi: 10.1007/s12032-011-0120-9.
- (24) Karn T, Pusztai L, Ruckhäberle E, Liedtke C, Müller V, Schmidt M, Metzler D, Wang J, Coombes KR, Gätje R, Hanker L, Solbach C, Ahr A, Holtrich U, Rody A, Kaufmann M. Melanoma antigen family A identified by the bimodality index defines a subset of triple negative breast cancers as candidates for immune response augmentation. *Eur J Cancer.* 2012 Jan;48(1):12-23.
- (25) Leong SPL. Selective sentinel lymphadenectomy for breast cancer in the United States. *Asian J Surg* 2004; 27: 268-274.

- (26) Neville AM, Price KN, Gelber RD, Goldhirsch A. Axillary node micrometastasis and breast cancer letter]. Lancet 1991; 337: 1110.
- (27) American Joint Committee on Cancer, AJCC.  
Disponibile en: <http://www.cancer.gov/espanol/recursos/hojas-informativas/deteccion-diagnostico/estadificacion>
- (28) Vijaya V. Mysorekar Sentinel Lymph Node Biopsy in Breast Cancer Volume 1, Number 1, February 2010, Pages 1-6 Published Online First February 1, 2010. Disponible en: <http://wjon.org/index.php/wjon/article/view/187/106>
- (29) Vorgias, Significación pronóstica de los factores que afectan al internado sin la enfermedad y supervivencia global del cáncer de mama del estadio II en Grecia. Estudio multivariable de series. Europ J Obste Ginecol reproduce biolog 2005; 1(5):433-7
- (30) Bettelheim R, Penman HG, Thorton-Jones H and colls., Prognostic significance of peritumoral vascular invasion in breast cancer. Br J Cancer 2001; 92: 771-777.
- (31) Rosen PP, Groshen S, Kinne DW y cols. Factors influencing prognosis in node negative breast carcinoma. Analysis of 767 T1N0M0/T2N0M0 patients with longterm follow up. J Clin Oncol 1993; 11: 2090-2100•
- (32) Ellis IO, Elston CW, Blamey RW, The Nottingham prognosis index (NPI) a combination of multiple prognostic factors derived from the Nottingham Tenovus primary cancer study. Mod Pathol 2001; 21: 11A
- (33) Page DL, Prognosis and breast cancer. Recognition of lethal and favorable prognostic types. Am J Surg Pathol, 2001; 35: 334-349
- (34) Tsuda H, Hirohashi S, Shimosato Y and colls., Correlation between histologic grade of malignancy and copy number of c-erbB-2 gene in breast carcinoma: A retrospective analysis of 176 cases. Cancer 2000; 75: 1794-1800
- (35) Smith B, Selby P, Southgate J, Pittman K, Bradley C, Blair GE. Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. Lancet 1991;338:1227-9
- (36) Gribben J, Nadler L. Detection of minimal residual disease. Cancer Treat Res 1995;76:249
- (37) Gabert J, Thuret I, Lafage M Carcassonne Y, et al. Detection of residual bcr/abl translocation by polymerase chain reaction in chronic myeloid leukaemia patients after bonemarrow transplantation. Lancet 1989;2:1125-8.
- (38) Brouillet JP, Theillet C, Maudelonde T and colls., Cathepsin D assay in primary breast cancer and lymph nodes: relationship with c-myc, c-erbB-2 and int-2 oncogéne amplification and node invasiveness. Eur J Cancer 2000; 56: 437-441.
- (39) Clement MA, Seguima, Reinó 6; et al. Prognostic valve of her – 2/ new and P53 expressions in mode \_ positive breast cancer. Her -2/ new effect on adjuvant Tamoxifen treatments Breast 2004: 10(1): 67 -7

- (40) Miguel, P., Herrera, A., Ponce de León, D. et al., El cáncer una enfermedad genética. Trabajo de revisión Correo Científico Médico de Holguín 2007;11(3)
- (41) Tobias ES, Black DM. The molecular biology of cancer. En: Emery and Rimoin□s. Principles and Practice of Medical Genetics. 4 edición, volumen 1, editores Rimoin DL, Connor JM, Pyeritz RE, Korf BR. Churchill Livingstone, Edinburgh 2002: 514-570
- (42) Yepes, Jesús Orlando, Gunturiz, María Luz, Henao, Luis Felipe et al. Differential display of messenger RNA and identification of selenocysteine lyase gene in hepatocellular carcinoma cells transiently expressing hepatitis C virus Core protein. Biomédica, June 2006, vol.26, no.2, p.194-205. ISSN 0120-4157
- (43) Ripa Saldias L, Guarch Troyas R, Hualde Alfaro A, De Pablo Cardenas A, Pinos Paul M, Santiago Gonzalez de Garibay A. Micropapillary carcinoma of the bladder: case report and review of the literature. Actas Urol Esp. 2005;29(4):408-413.
- (44) Langer I, Marti WR, Guller U et al: Axillary recurrence rate in breast cancer pacientes with negative sentinel lymph node or micrometástasis. Ann. Surg. 241 (1) : 152-158,2005.
- (45) Arrechea Irigoyen, M., Vicente García, F., Ibáñez Beroiz, B., Córdoba Iturriagagoitia, A., Santamaría Martínez, M., & Guillén Grima, F. (2011). Subtipos moleculares del cáncer de mama: implicaciones pronósticas y características clínicas e inmunohistoquímicas. Anales Del Sistema Sanitario De Navarra, 34(2), 219-233.  
Consultado de <http://recyt.fecyt.es/index.php/ASSN/article/view/11749>  
Disponible en: <<http://recyt.fecyt.es/index.php/ASSN/article/view/11749>>
- (46) Watson MA, Dintzis S, Darrow CM, Voss LE, DiPersio J, Jensen R, Fleming TP. Mammaglobin expression in primary, metastatic, and occult breast cancer. Cancer Res 1999; 59:3028-31.
- (47) Marchetti A, Buttitta F, Bertacca G, Zavaglia K, Bevilacqua G, Angelucci D, Viacava P, Naccarato A, Bonadio A, Barassi F, Felicioni L, Salvatore S, Mucilli F. mRNA markers of breast cancer nodal metastases: comparison between mamaglobin and carcinoembryonic antigen in 248 patients. J Pathol 2001; 95:186-90.
- (48) Bhargava R, Beriwal S, Dabbs DJ. Mammaglobin vs GCDFP-15: an immunohistologic validation survey for sensitivity and specificity. Am J Clin Pathol. 2007;127:103–113.
- (49) Aihara T, Fijiwara Y, Ooka M, et al. Mammaglobin B as a novel marker for detection of breast cancer micrometastases in axillary lymph nodes by reverse transcription–polymerase chain reaction. Breast Cancer Res Treat. 1999;58:137–140.
- (50) Taback B, Hashimoto K, Kuo CT, Chan A, Giuliano AE, Hoon DS. Molecular lymphatic mapping of the sentinel lymph node. Am J Pathol. 2002;161:1153-61
- (51) Washer RA, Bostick PJ, Huynh KT, Tuner R, Giuliano AE, Hoon DSB. Detection of MAGE-A3 in breast cancer patients sentinel lymph nodes. Br J Cancer 2001; 9:1340-6.
- (52) Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24 740 breast cancer cases. Cancer 1989; 63: 181-7

- (53) Cohen C, Alazraki N, Styblo T, Waldrop SM, Grant SF, Larsen T. Immunohistochemical evaluation of sentinel lymph nodes in breast carcinoma patients. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2002; 10: 296-303
- (54) Weaver DL. Sentinel lymph nodes and breast carcinoma. Which micrometastases are clinically significant? *Am J Surg Pathol* 2003; 27: 842-845.
- (55) Lemonier MK, kalma. Prognosis Associated with survival after breast cancer recurrent, acts *Oncol* 2005;30(5):583–6
- (56) Joensuu H, Isola J, Lundin M, et al. Amplification of erbB2 and erbB2 expression are superior to estrogen receptor status as risk factors for distant recurrence in pT1N0M0 breast cancer: a nationwide population-based study. *Clin Cancer Res.* 2003;9:923–30.