



Universidad de Oviedo

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD**

**TESIS DOCTORAL**

**ANÁLISIS DEL INFILTRADO LINFOCITARIO  
TUMORAL (TILs) COMO FACTOR PREDICTIVO  
DEL ESTADO GANGLIONAR EN CÁNCER DE  
MAMA PRECOZ. RELACIÓN CON FACTORES  
PRONÓSTICOS Y PREDICTIVOS CLÁSICOS.**

**M<sup>a</sup> Ana Llaneza Folgueras**

**Oviedo, 2023**





## RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Análisis del Infiltrado Linfocitario Tumoral (TILs) como factor predictivo del estado ganglionar en cáncer de mama precoz. Relación con factores pronósticos y predictivos clásicos	Inglés: Analysis of tumor lymphocyte infiltrate (TILs) as a predictive factor of nodal status in early breast cancer. Relationship with classic prognostic and predictive factors

2.- Autor	
Nombre: M <sup>a</sup> Ana Llaneza Folgueras	
Programa de Doctorado: CIENCIAS DE LA SALUD. Investigación en Cirugía y Traumatología	
Órgano responsable:	

### RESUMEN (en español)

El cáncer de mama es el más frecuente en las mujeres. Con la mejora de las técnicas diagnósticas y la mayor concienciación de las mujeres, el cáncer de mama se diagnostica en estadios más precoces, pero el estado ganglionar continúa siendo uno de los factores pronóstico independiente más importante.

En la década de los 90, tras los estudios de Krag, la biopsia selectiva del ganglio centinela se convierte en la técnica de elección en las pacientes con cáncer de mama sin afectación axilar clínica ni radiológica. En los casos de afectación metastásica del ganglio centinela está indicada la realización de la linfadenectomía axilar, pero hasta en un 30- 70 % de los casos no se objetiva afectación de otros ganglios no centinela. La linfadenectomía axilar no está exenta de morbilidad (síndrome de red axilar, alteración de la movilidad de la articulación gleno-humeral, linfedema, linfangitis) y, dada la elevada incidencia del cáncer de mama y su gran prevalencia, dichos efectos secundarios suponen un problema sanitario.

Paralelamente a la implementación de la biopsia selectiva del ganglio centinela, se han buscado factores que permitan distinguir los casos de afectación del ganglio centinela en los que se podría evitar el tratamiento loco-regional axilar, sin perjuicio en la supervivencia global y libre de enfermedad. En los últimos años está adquiriendo importancia el estudio no sólo del tumor sino también del entorno peritumoral, fundamentalmente del infiltrado linfocitario del estroma tumoral, cuyo análisis es factible en la pieza de biopsia percutánea teñida con hematoxilina-eosina, sin sobrecoste económico. El estudio del ganglio centinela se puede realizar con diversas técnicas histológicas, pero desde el año 2007, gracias a los estudios de Tsujimoto, se puede analizar mediante la técnica molecular OSNA con gran precisión y reproducibilidad, sin variabilidad interobservador.

En nuestro trabajo nos planteamos el estudio del infiltrado linfocitario tumoral en las muestras de biopsia percutánea como un factor predictivo del estado ganglionar, como factor independiente y su relación con factores pronóstico-predictivos clásicos, así como su relación con el valor de la carga tumoral en el ganglio centinela con el método molecular OSNA.

Estudiamos 83 pacientes en las que se analizó el ganglio centinela intraoperatoriamente mediante el método molecular OSNA, distinguiendo dos grupos: uno con ganglio centinela sin afectación metastásica y otro con afectación metastásica



en el que se realizó la linfadenectomía axilar. Se analizaron parámetros clínicos, radiológicos y patológicos que se conocían de forma preoperatoria.

#### Conclusiones

El infiltrado linfocitario tumoral no demostró valor predictivo del estado ganglionar.

La carga tumoral del ganglio centinela determinada por OSNA predice la afectación axilar, pero no se relaciona con el infiltrado linfocitario tumoral.

### RESUMEN (en Inglés)

Breast cancer is the most common cancer in women. With improved diagnostic techniques and greater awareness among women, breast cancer is diagnosed at earlier stages, but nodal status remains one of the most important independent prognostic factors.

In the 1990s, after the studies of Krag, selective biopsy of the sentinel lymph node became the technique of choice in patients with breast cancer without clinical or radiological axillary involvement. In cases of metastatic involvement of the sentinel node, axillary lymphadenectomy is indicated, but in 30-70% of cases, no involvement of other non-sentinel nodes is observed. Axillary lymphadenectomy is not without morbidity (axillary web syndrome, shoulder mobility impairment, lymphedema, lymphangitis), and given the high incidence and prevalence of breast cancer, these side effects pose a healthcare problem.

In parallel with the implementation of selective biopsy of the sentinel lymph node, factors have been sought to distinguish cases of sentinel lymph node involvement in which axillary loco-regional treatment could be avoided without compromising overall and disease-free survival. In recent years, the study of not only the tumor but also the peritumoral environment, particularly the lymphocytic infiltrate of the tumor stroma, whose analysis is feasible in the hematoxylin-eosin-stained percutaneous biopsy specimen without economic overhead, has become important. The sentinel lymph node can be studied using various histological techniques, but since 2007, thanks to the studies of Tsujimoto, it can be analyzed using the molecular OSNA technique with great precision and reproducibility, without interobserver variability.

In our study, we aimed to investigate the lymphocytic infiltrate of the tumor in percutaneous biopsy samples as a predictive factor of nodal status, as an independent factor, and its relationship with classic prognostic-predictive factors, as well as its relationship with the value of tumor burden in the sentinel lymph node with the OSNA molecular method.

We studied 83 patients in whom the sentinel lymph node was analyzed intraoperatively using the OSNA molecular method, distinguishing two groups: one with non-metastatic sentinel lymph node and the other with metastatic involvement, in which axillary lymphadenectomy was performed. Preoperative clinical, radiological, and pathological parameters were analyzed.

#### Conclusions



Universidad de Oviedo

Tumor lymphocytic infiltrate did not demonstrate predictive value of nodal status.

Tumor burden in the sentinel lymph node determined by OSNA predicts axillary involvement but is not related to tumor lymphocytic infiltrate.

**SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO  
EN CIENCIAS DE LA SALUD.**

A José Carlos, Patricia y Diego,  
el gran apoyo en mi día a día.

## AGRADECIMIENTOS

---

Esta tesis doctoral es la culminación de un intenso trabajo de investigación conseguido gracias a un gran número de personas a las que quiero expresar mi más profundo agradecimiento.

A la Dra. M<sup>a</sup> del Carmen González del Rey, Co-directora de esta tesis, gran profesional y sin cuyo trabajo, apoyo incondicional, consejos y su gran paciencia, nunca hubiera sido posible llegar a realizar este trabajo.

Al Dr. Ignacio González-Pinto, Co- director de esta tesis, que ante momentos poco favorables me animó siempre a continuar.

A mis tutores, Dr. Safwan Escaf, que me guió en este trabajo en momentos duros y al Dr. Emilio Esteban, sin cuyo apoyo en los momentos finales no hubiera podido alcanzar el objetivo.

A José Fernández, por su gran disposición e inestimable ayuda y paciencia en el análisis e interpretación de los resultados del estudio estadístico.

A Begoña Alonso, Dania Calvo y Ana Encinas, mis compañeras de la Unidad de Mama del Hospital Universitario Central de Asturias, que siempre me apoyan; y al resto de mis compañeras con las que trabajo cada día y sin las cuales no podría llevar a cabo todos los proyectos en los que estamos trabajando con el único objetivo de proporcionar a nuestros pacientes la mejor atención.

A mi jefe el Dr. José Granero, que con su estímulo contribuyó a que llevara a cabo este trabajo.

No quiero olvidarme de las personas que desde pequeña me inculcaron el esfuerzo y la superación y a las que debo todo aunque ya no están aquí, sé que se sentirían muy felices, mis padres Carolina y Urbano.

Y por último a mi gran familia, José Carlos, Patricia y Diego, gracias por su apoyo, confianza y paciencia en momentos complicados, conscientes de que ha sido un tiempo en el que no he podido disfrutar de ellos.

## ABREVIATURAS

---

<b>BAG</b>	Biopsia con Aguja Gruesa
<b>BSGC</b>	Biopsia Selectiva del Ganglio Centinela
<b>CK</b>	Citoqueratina
<b>CM</b>	Cáncer de Mama
<b>CTT</b>	Carga Tumoral Total
<b>GC</b>	Ganglio Centinela
<b>GH</b>	Grado Histológico
<b>GNC</b>	Ganglio No Centinela
<b>HE</b>	Hematoxilina-Eosina
<b>ILV</b>	Invasión Linfo -Vascular
<b>IMC</b>	Índice de Masa Corporal
<b>LA</b>	Linfadenectomía Axilar
<b>OSNA</b>	One Step Nucleid acid Amplification
<b>PAAF</b>	Punción Aspiración con Aguja Fina
<b>RE</b>	Receptores de Estrógenos
<b>RP</b>	Receptores de Progesterona
<b>RA</b>	Receptores de Andrógenos
<b>TNM</b>	Clasificación <b>T</b> (Tamaño tumor) <b>N</b> (Ganglios linfáticos) <b>M</b> (Metástasis a distancia)
<b>TILs</b>	Infiltrado Linfocitario Tumoral
<b>TN</b>	Triple Negativo



<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>16</b>
1.1. Epidemiología.....	18
1.2. Factores de riesgo .....	19
1.2.1. Factores de riesgo no modificables.....	19
1.2.2. Factores de riesgo modificables.....	21
1.3. Diagnóstico .....	24
1.3.1. Exploración .....	24
1.3.2. Estudios de imagen .....	24
1.3.3. Estudio anatomopatológico.....	26
1.4. Estadificación del cáncer de mama.....	27
1.5. Factores pronósticos y predictivos.....	28
1.5.1. Factores pronósticos dependientes del paciente .....	29
1.5.2. Factores pronósticos dependientes del tumor .....	29
1.5.3. Clasificación molecular .....	36
1.5.4. Perfiles génicos pronósticos.....	40
1.5.5. Índices pronósticos.....	44
1.6. Tratamiento del cáncer de mama .....	44
1.6.1. Tratamiento quirúrgico .....	45
1.6.2. Tratamiento locorregional radioterápico.....	47
1.6.3. Tratamiento sistémico.....	49
1.7. Comorbilidad asociada al tratamiento locorregional axilar.....	50
1.8. Biopsia selectiva de ganglio centinela .....	53
1.8.1. Antecedentes históricos .....	53
1.8.2. Concepto de ganglio centinela.....	54
1.8.3. Técnicas de detección del ganglio centinela.....	57
1.8.4. Estudio anatomopatológico del ganglio centinela .....	60
1.9. Infiltrado inflamatorio tumoral .....	63
1.10. ¿Es posible evitar la linfadenectomía axilar si un ganglio centinela es metastásico?.....	65

<b>2. JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS .....</b>	<b>68</b>
<b>3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>71</b>
3.1. Hipótesis de trabajo .....	71
3.2. Objetivos.....	71
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>74</b>
4.1. Diseño del estudio.....	74
4.2. Población a estudio .....	74
4.3. Obtención y procesamiento de las muestras .....	79
4.3.1. Valoración del Infiltrado Linfocitario Tumoral (TILs) .....	80
4.4. Técnica de marcaje del ganglio centinela e identificación intraoperatoria.....	83
4.5. Estudio intraoperatorio del ganglio centinela mediante método molecular OSNA .....	85
4.6. Estudio diferido de los ganglios no centinela .....	88
4.7. Análisis de datos y método estadístico .....	89
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>92</b>
5.1. Características clínicas y patológicas .....	92
5.2. Factores radiológicos y patológicos.....	99
5.3. TILs y características clínicas, radiológicas y patológicas .....	101
5.4. Pacientes con ganglio centinela positivo vs ganglio centinela negativo .....	105
5.4.1. Variables clínicas y estado del ganglio centinela .....	106
5.4.2. Variables radiológicas y estado del ganglio centinela .....	108
5.4.3. Variables anatomopatológicas y estado del ganglio centinela.....	109
5.4.4. Infiltrado linfocitario tumoral y estado del ganglio centinela.....	112
5.5. Tratamiento quirúrgico de la mama y de la axila .....	113
5.6. Pacientes con ganglios no centinela positivos vs ganglios no centinela negativos .....	114
5.6.1. Variables clínicas y afectación de ganglios no centinela.....	115
5.6.2. Variables radiológicas y afectación de ganglios no centinela .....	116
5.6.3. Variables anatomo-patológicas y afectación de ganglios no centinela...	117
5.6.4. Infiltrado linfocitario tumoral y afectación de ganglios no centinela .....	120
5.7. Supervivencia .....	120
<b>6. DISCUSIÓN .....</b>	<b>124</b>

---

<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>141</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>144</b>
8.1. Autorización del comité de ética .....	144
8.2. Microfotografías .....	145
8.3. Índice de Tablas y Figuras.....	148
Tablas.....	148
Figuras.....	149
<b>9. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>152</b>

# 1

## Introducción

---

## 1. INTRODUCCIÓN

---

El Cáncer de Mama (CM) es la neoplasia maligna más frecuente y la primera causa de muerte por cáncer en las mujeres de países industrializados.

A finales del siglo XIX, Halsted describió la primera estrategia terapéutica con la resección conjunta de la mama y los ganglios linfáticos regionales, siendo el tratamiento locorregional estándar, con pequeñas modificaciones, durante casi un siglo (1).

Los numerosos avances científicos producidos durante el siglo XX se vieron reflejados en el cambio en el tratamiento del CM. La aplicación de las radiaciones ionizantes, el conocimiento biológico de las vías de diseminación y la consideración del CM como una enfermedad sistémica desde el inicio que podría beneficiarse de los tratamientos sistémicos, propiciaron un cambio radical en la estrategia terapéutica del mismo.

En 1991, el *National Institutes of Health Consensus Conference*, teniendo en cuenta los resultados respecto al control local y la supervivencia descritos en diversos estudios, fundamentalmente en los de Umberto Veronesi y de Fisher, propuso el tratamiento conservador de la mama con radioterapia adyuvante para el CM en estadio I y II (2) (3).

Si bien a nivel de la mama la cirugía ha tenido tendencia a hacerse más conservadora, la Linfadenectomía Axilar (LA) sigue siendo una práctica necesaria, ya que la afectación ganglionar metastásica continua siendo hoy en día el factor pronóstico independiente más importante en el CM (4).

La mayor sensibilización de las mujeres frente al CM, junto con las campañas de cribado, han permitido un diagnóstico en fases más tempranas y sin afectación ganglionar en muchas LA. Esto último impulsó la investigación de alguna técnica que

permitiera seleccionar los casos de CM en los que se pudiera evitar la LA. Anatómicamente el sistema linfático constituye una red más o menos compleja, pero desde el punto de vista funcional se produce un determinado orden direccional del flujo tumoral eferente, que se traduce en una "progresión ordenada" de las metástasis linfáticas tumorales cuando se inicia la invasión a distancia. Por tanto, la localización y biopsia del primer ganglio va a predecir el estado histológico del resto de ganglios axilares. A finales de los años 90, se publicaron los primeros trabajos sobre la Biopsia Selectiva del Ganglio Centinela (BSGC) en CM y, desde entonces, dicha técnica se ha estandarizado con gran rapidez, evitando LA innecesarias y las secuelas derivadas de dicho tratamiento (5).

La LA se realiza en el caso de afectación metastásica del Ganglio Centinela (GC) para determinar el estado del resto de los Ganglios No Centinela (GNC). Sin embargo, la necesidad de dicha cirugía axilar es muy discutida actualmente, ya que se ha evidenciado que el GC es el único ganglio afectado hasta en un 70% de los casos, tras el estudio de los ganglios del vaciamiento axilar (6). Por ello, actualmente se propone no realizar LA en casos seleccionados, aunque presenten afectación del GC.

El conocimiento del estado ganglionar es un factor pronóstico y predictivo fundamental para plantear el mejor tratamiento a las pacientes con CM. Por esto, el análisis del GC se realiza mayoritariamente como estudio intraoperatorio (citológico vs histológico) y más recientemente, en muchos centros hospitalarios, se utiliza la técnica molecular OSNA (*One Step Nucleid acid Amplification*). Esta técnica tiene una alta sensibilidad y especificidad y, además, ha permitido la estandarización diagnóstica y el análisis del ganglio en su totalidad (7).

Es necesario investigar nuevos factores que nos permitan definir qué pacientes con un GC positivo podrían beneficiarse de no recibir ningún tratamiento axilar local (quirúrgico ni radioterápico), evitando así la comorbilidad asociada y su repercusión en la calidad de vida.

En los últimos años, hay muchos estudios que describen la importancia del Infiltrado Linfocitario Tumoral (TILs) como factor pronóstico- predictivo en el CM. El análisis histológico de los TILs se ha realizado fundamentalmente en el tumor una vez

extirpado (pieza quirúrgica), pero es importante también su análisis en a las muestras obtenidas con la biopsia percutánea radiológica, ya que en estudios clínicos recientes se evidencia que un nivel elevado de TILs es predictivo de una mejor respuesta a la neoadyuvancia (8) . El análisis de los TILs, junto con otros factores pronósticos y predictivos clásicos, podría ayudar a seleccionar los casos en los que evitar la LA.

### 1.1. EPIDEMIOLOGÍA

El cáncer constituye una de las principales causas de morbilidad y mortalidad del mundo. La *International Agency for Research on Cancer* estimó que, en el año 2020, se diagnosticaron unos 18,1 millones de nuevos casos de cáncer en el mundo (excluyendo los tumores cutáneos no melanomas) y que dicha cifra aumentará en las próximas dos décadas hasta los 27 millones de casos. El tumor más frecuentemente diagnosticado en el año 2020 fue el CM. En España, se estima que el número de casos diagnosticados de cáncer alcanzó los 280.100 según REDECAN (2020), correspondiendo el mayor número de casos al colon y recto (43.370 casos nuevos), seguido del CM con 34.750 en mujeres. La Asociación Norteamericana de Registros Centrales del Cáncer (NAACCR) hace referencia a los casos de CM en el varón, con un total de 2.710 casos, frente a los 934.870 casos de CM en la mujer, del total de 1.918.030 casos estimados de cáncer en Estados Unidos en el año 2020 (9). Estamos asistiendo a una tasa de incidencia de CM que aumenta lentamente en aproximadamente un 0,5% por año. Esto se atribuye a diversos factores como el envejecimiento de la población, el aumento del sobrepeso/obesidad, la disminución de la tasa de fertilidad y los programas de detección precoz.

La supervivencia del CM a los 5 años es superior al 85%, gracias al diagnóstico en estadio temprano y a la terapia más efectiva, lo que supone que es un cáncer con una gran prevalencia. En España, según los datos proporcionados por el Instituto Nacional de Estadística (INE), en el año 2020, la prevalencia estimada del CM a los cinco años fue de 144.233 casos.

No se debe olvidar que el cáncer en España es la segunda causa de muerte y que el CM es el responsable de la mayor mortalidad por cáncer en las mujeres, estimándose que en 2022 ha ocasionado 6.572 fallecimientos.

## 1.2. FACTORES DE RIESGO

El CM es una enfermedad en cuyo desarrollo están implicados múltiples factores que incrementan la probabilidad de padecerlo. Aunque los factores étnicos son importantes, los culturales y dietéticos lo son aún más, si se tiene en cuenta que las cifras de incidencia se igualan en poblaciones migrantes en una o dos generaciones (10).

Es importante conocer los factores de riesgo que aumentan la posibilidad de padecer esta enfermedad, pues hay factores modificables sobre los cuales se puede actuar en términos de prevención primaria.

### 1.2.1. Factores de riesgo no modificables

**SEXO:** El 99% de los CM se presentan en mujeres.

**EDAD:** Es uno de los factores de riesgo más importante, aumentando progresivamente la incidencia con la edad. La mayoría de los CM se desarrollan por encima de los 40 años y, únicamente, el 1,5% antes de los 30 años, estando muchos de estos casos asociados a alteraciones genéticas. En la premenopausia, la frecuencia aumenta progresivamente hasta alcanzar una meseta entre los 45-55 años. En España, el total de mujeres afectadas por CM es un 0,24% de la población total de mujeres mayores de 65 años y un 0,12% del total de mujeres entre 15- 65 años.

**FACTORES ÉTNICOS Y RACIALES:** Determinadas razas, entre ellas la judía, tienen mayor riesgo de padecer CM, independientemente de otros factores. Globalmente, las mujeres de raza blanca presentan un mayor riesgo de desarrollar CM que las mujeres de raza negra o asiática y las mujeres hispanas presentan menor riesgo que las de raza caucásica. Sin embargo, el impacto de la raza está sesgado por el estilo



de vida, ya que población migrante puede ver modificado su riesgo inicial relacionado con la raza (11).

**ANTECEDENTES FAMILIARES:** El riesgo de CM es mayor en mujeres con antecedentes familiares de primer grado, el doble si el diagnóstico fue antes de los 50 años. Sin embargo, hay que tener en cuenta que 8 de cada 9 mujeres que lo desarrollan no presentan familiares de primer grado afectas. Además, en la mayoría de los casos, este aumento de riesgo es atribuible a factores ambientales compartidos.

Teniendo en cuenta los antecedentes familiares podríamos clasificar el CM en:

- **Esporádicos:** Sin antecedentes en dos o más generaciones. Es el más frecuente, constituyendo el 75% de los casos.
- **Agregación familiar:** Varios miembros de la familia con parentesco de primer y segundo grado sufren la enfermedad, existe agregación, pero genéticamente es inespecífica. Se cree que en su desarrollo están implicados tanto factores ambientales como sociales y genéticos. Se presenta en el 15-25% de los casos.
- **Hereditario:** Representa entre el 5-10% de todos los casos. Se conoce como "cáncer familiar" y existen varios genes responsables. La principal causa de cáncer de mama y ovario hereditario conocida es la mutación de los genes *BRCA1* (localizado en el cromosoma 17q2-21) y *BRCA2* (localizado en el cromosoma 13q12-13). Los individuos portadores de estas mutaciones presentan una susceptibilidad muy alta para desarrollar CM y otros tumores relacionados, como cáncer de ovario, próstata, melanoma y páncreas. Son genes de alta penetrancia que se heredan de forma autosómica dominante. Además, en este grupo de pacientes, la aparición del CM es a una edad más temprana y con frecuencia es bilateral (12). Inicialmente se pensó que estos dos genes explicarían casi el 100% de los casos de cáncer de mama y/o ovario familiar, pero tan sólo un 25% son atribuibles a dichas mutaciones. Otros genes que se asocian con un riesgo significativo de CM son *P53*, *PTEN*, *ATM*, *CHEK2* y *PALB2*. Actualmente, las técnicas de secuenciación

son más asequibles, permitiendo ofrecer en la práctica médica un mejor consejo genético de susceptibilidad al cáncer, pero siempre con la cautela de que la estimación precisa del riesgo de cáncer en muchos casos aún no está disponible (13).

**ANTECEDENTES PERSONALES DE PATOLOGÍA MAMARIA:** El antecedente de CM, tanto infiltrante como *in situ*, implica un riesgo intermedio de desarrollar un CM. Se estima que la tasa anual de recurrencia locorregional es del 1,0-1,5 % y el riesgo de un nuevo CM ipsilateral o contralateral permanece durante 15-20 años, aunque esto varía según la edad de la mujer y el subtipo histológico de CM (14).

Las lesiones consideradas no proliferativas no confieren riesgo aumentado de desarrollar CM. En las lesiones proliferativas sin atipia (hiperplasia ductal usual, papiloma intraductal, cicatriz radial, fibroadenoma, adenosis esclerosante), el incremento del riesgo es mínimo (RR1-2). Si se trata de lesiones proliferativas con atipia (hiperplasia ductal atípica), el riesgo se incrementa (RR 4,24) y es para ambas mamas (15). El conocimiento de estas lesiones es muy importante por las implicaciones que tienen en relación con su seguimiento (16).

También existe una fuerte asociación entre el aumento de densidad mamaria en la mamografía y el riesgo de desarrollar CM. Se estima que el riesgo de CM es de 2 a 6 veces mayor para mujeres con densidad mamaria alta (17).

**FACTORES REPRODUCTIVOS:** Una menarquia precoz (< 12 años) y una menopausia tardía (> 50 años), son factores que aumentan el riesgo de CM, ya que condicionan una mayor exposición temporal del tejido mamario a los estrógenos ováricos. El riesgo aumenta tanto para tumores con expresión de receptores hormonales como para los que no los expresan (18).

### 1.2.2. Factores de riesgo modificables

**PARIDAD Y EDAD DE LA PRIMERA GESTACIÓN:** El CM con expresión de receptores de estrógenos y progesterona es el que presenta una relación más consistente con factores reproductivos. El aumento de la edad de la primera gestación se

asocia con un mayor riesgo de CM. En cuanto al número de hijos, se considera como un factor de protección cuando es mayor de 4-5 hijos y en mujeres diagnosticadas de CM por encima de los 40 años. Sin embargo, los tumores que no expresan receptores hormonales y los que sobreexpresan HER2, no tienen una relación estadísticamente significativa con la edad de la primera gestación ni con el número de hijos (18).

**NULIPARIDAD:** Se asocia a un mayor riesgo de CM, incrementándose a partir de los 70 años.

Por el contrario, la esterilidad, parece representar un factor protector.

**LACTANCIA MATERNA:** Se asocia con un riesgo menor de padecer CM y su duración está directamente relacionada con el efecto protector (19).

### **TRATAMIENTOS HORMONALES**

**Anticonceptivos hormonales:** La anticoncepción hormonal se asocia con un mayor riesgo de CM, fundamentalmente en mujeres premenopáusicas que la han recibido durante períodos de tiempo largos (> 5-10 años), persistiendo el riesgo durante al menos 5 años tras la interrupción de la anticoncepción. Sin embargo, dado que el riesgo de CM atribuible a la anticoncepción hormonal entre las mujeres premenopáusicas es bajo, su uso no debería ser un inconveniente teniendo en cuenta los beneficios de los anticonceptivos hormonales, como la buena eficacia anticonceptiva y la reducción de los riesgos de cáncer de ovario, endometrio y colorrectal (20) (21).

**Terapia hormonal sustitutiva:** Los estudios más recientes no han podido confirmar una relación causal clara de la terapia hormonal sustitutiva con el CM, tal y como indicaban los datos del *Women's Health Initiative* (WHI) en el año 2002. No obstante, su uso estaría justificado al disminuir la morbilidad y mortalidad por osteoporosis y cardiopatías (22).

**PESO:** El incremento del Índice de Masa Corporal (IMC) está asociado a un mayor riesgo de CM en mujeres postmenopáusicas, fundamentalmente por la mayor producción de estrógenos en el tejido adiposo por aromatización de esteroides

producidos en la glándula suprarrenal. Este riesgo es mayor si, además, el CM expresa receptores estrogénicos (23).

**RADIACIÓN IONIZANTE:** La exposición a radiaciones ionizantes con carácter terapéutico aumenta el riesgo de CM especialmente si el tratamiento es en la infancia o en la adolescencia, no si es a una edad superior a los 45 años. El riesgo es muy bajo si se trata de una prueba diagnóstica mamográfica, excepto en mujeres portadoras de la mutación *BRCA 1* y *2* expuestas a estas radiaciones antes de los 40 años (24).

#### **ESTILO DE VIDA:**

**Alcohol:** Se ha demostrado su relación con el desarrollo del CM en la mujer tanto premenopáusicas como postmenopáusicas. Un metaanálisis reciente ha demostrado que un aumento de 10 gr. en el consumo de alcohol por día, aumenta el riesgo un 5% entre las mujeres premenopáusicas y un 9 % en las postmenopáusicas (25) (26).

**Tabaco:** Se relaciona con un incremento en el riesgo de padecer CM, pero su verdadero impacto es controvertido. Fumar parece tener efectos adversos si el inicio es en la adolescencia o en la edad adulta temprana antes de la primera gestación, por una mayor susceptibilidad a los carcinógenos químicos antes de la diferenciación completa de la mama. Parece tener mayor relación con el CM en premenopáusicas, aunque también se ha relacionado con el CM postmenopáusicas (27) (28).

**Ejercicio físico:** La práctica de ejercicio físico moderado y continuo parece que reduce el riesgo de CM.

**Alimentación:** La dieta parece estar modestamente asociada con la enfermedad. Una alimentación rica en grasas animales aumentaría el riesgo de CM y el mayor consumo de frutas y verduras lo disminuiría (29).

**Riesgo laboral:** Se ha encontrado cierta relación entre determinadas profesiones y un mayor riesgo de CM. Aunque los resultados no son concluyentes, parece que existe una asociación con turnos laborales nocturnos, relacionado con la alteración-supresión de la producción de melatonina (30).

### 1.3. DIAGNÓSTICO

#### 1.3.1. Exploración

La mayor parte de las guías clínicas destacan la importancia de la exploración física en el seguimiento de pacientes diagnosticadas de CM para la detección de recidivas. Sin embargo, no se conoce con exactitud si la exploración física sistemática contribuye realmente a una detección temprana y a una mejora de la supervivencia.

#### 1.3.2. Estudios de imagen

##### **MAMOGRAFÍA**

Es el método de imagen de elección para el diagnóstico de patología mamaria y lo suficientemente sensible para detectar el cáncer en fase temprana. Dado que se emplea radiación ionizante, no se recomienda su realización antes de los 30 años.

Se utiliza en dos escenarios diferentes: en el cribado en pacientes asintomáticas (en España se siguen las recomendaciones del Consejo de Europa y se realiza entre los 50 y 69 años con carácter bienal) y en el diagnóstico en pacientes sintomáticas.

En los últimos años la mamografía analógica ha sido sustituida por la mamografía digital, que permite la eliminación de ciertos artefactos, aumentando la eficiencia.

Para mejorar la calidad de los informes de las mamografías, el Colegio Americano de Radiología, en el año 1993, desarrolló el sistema BIRADS (*Breast Imaging Reporting and Data Systems*) para la elaboración de informes de forma estandarizada (31). Esta clasificación se aplica también en la ecografía y resonancia magnética de la mama. Clasifica las lesiones en 7 categorías en función de la probabilidad de malignidad y establece recomendaciones de actuación (Tabla 1) (32).

**Tabla 1: Clasificación radiológica de la imagen de mama del Colegio Americano de Radiología (BIRADS).**

CLASIFICACIÓN BIRADS	
BI-RADS 0	Se necesitan pruebas adicionales de imagen para poder comparar
BI-RADS 1	Mamas normales
BI-RADS 2	Mamas con hallazgos benignos
BI-RADS 3	Mamas con hallazgos probablemente benignos
BI-RADS 4	Lesiones con un grado de sospecha de malignidad entre 2 y 95 % (necesidad de biopsia percutánea)
BI-RADS 5	Mamas con hallazgos altamente sugestivos de malignidad (precisa diagnóstico histológico)
BI-RADS 6	Malignidad confirmada

## TOMOSÍNTESIS

Es una técnica más reciente, en la cual, para obtener la imagen, el tubo de rayos X se mueve en un arco de amplitud variable (entre 11° y 60 °) emitiendo múltiples pulsos de radiación de baja dosis, que atraviesan la mama comprimida y son recogidos por el detector. La información es procesada y reconstruida en cortes (normalmente de 1 mm de espesor) paralelos al detector, obteniendo imágenes consecutivas de la mama que conforman el estudio de tomosíntesis. Su principal ventaja es la disminución de la superposición del tejido, lo que permite mejorar la precisión diagnóstica frente al estudio 2 D, y ayuda a diagnosticar tumores de menor tamaño, contribuyendo así a mejorar el pronóstico (33).

## ECOGRAFÍA

Es una herramienta de gran utilidad en el estudio del tejido mamario. La imagen se obtiene mediante la utilización de ultrasonido. Es la técnica de elección en pacientes menores de 35 años, gestantes o en periodo de lactancia. Así mismo, es la técnica de imagen complementaria de la mamografía y la resonancia magnética y siempre es necesaria para el estudio adecuado de las mamas densas.

Es la guía para la realización de procedimientos intervencionistas como la Punción Aspiración con Aguja Fina (PAAF), la Biopsia con Aguja Gruesa (BAG) o el marcaje quirúrgico de lesiones no palpables.

La ecografía de mama debe incluir la exploración de las regiones axilares en busca de ganglios sospechosos en el diagnóstico de CM (34). La sospecha ecográfica de afectación metastásica axilar apoyada por confirmación histológica es una de las contraindicaciones absolutas para la realización de la BSGC. Los criterios ecográficos de malignidad son: forma redondeada (diámetro longitudinal/ diámetro transversal  $<1,5$ ), ausencia de hilio, engrosamiento de la cortical ( $>3,5$ mm) o engrosamiento cortical focal (35).

## **RESONANCIA MAGNÉTICA (RM)**

Es una valiosa herramienta en la evaluación del tejido mamario que aporta información morfológica sobre las lesiones mamarias y, con el uso de contraste endovenoso (gadolinio), permite conocer datos acerca de la vascularización y cinética circulatoria de las mismas, permitiendo distinguir el tejido maligno (con una captación intensa y precoz) del parénquima mamario normal (36). Por ello, la RM es el método de imagen más sensible para la detección de CM infiltrante, con una alta sensibilidad (90%) y con una especificidad del 75% (37).

### **1.3.3. Estudio anatomopatológico**

Los distintos métodos de imagen nos permiten la toma de muestras representativas del tumor de mama (PAAF, BAG o BAV) para su estudio anatomopatológico. Este permite confirmar la malignidad y realizar el estudio inmunohistoquímico de factores pronóstico-predictivos de forma preoperatoria. Así, se evita la realización de una biopsia quirúrgica y se facilita las decisiones terapéuticas.

El carcinoma de mama infiltrante más frecuente es el ductal “no específico” (NST), que supone alrededor del 75% de todos los CM. La última clasificación histopatológica correspondiente a los carcinomas infiltrantes de mama fue publicada por la OMS en 2019 (38).

#### 1.4. ESTADIFICACIÓN DEL CÁNCER DE MAMA

La estadificación hace referencia a la extensión de la enfermedad para ayudar a implementar una estrategia terapéutica en cada paciente, estimar el pronóstico y comparar los resultados de diferentes opciones terapéuticas. Desde 1977, la *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) realiza una clasificación basada en hallazgos anatómicos (T tamaño tumoral, N afectación ganglionar, M existencia o no de metástasis a distancia) que conocemos como sistema TNM (*Tumor, Node, Metastases*) (Tabla 2). Este sistema de estadificación ha sido aceptado internacionalmente y desde su inicio se han realizado revisiones y actualizaciones periódicas. La 8ª Edición del Manual de Estadificación AJCC (2018) incluye factores biológicos contemporáneos (receptores hormonales de estrógenos y progesterona, grado histológico y estado de HER2) y recomienda el uso de plataformas genómicas para el CM (39). Esta actualización está demostrando una predicción mejor del pronóstico de las pacientes con CM (40). Pero es necesario tener presente las clasificaciones TNM previas para poder realizar estudios comparativos (41).

Tabla 2: Resumen de la Clasificación TNM para CM (AJCC, 2018)

CATEGORIA		CRITERIOS
T (Tamaño Tumor)	TX	Tumor primario no puede ser evaluado
	T0	No hay evidencia de tumor primario
	Tis	Carcinoma in situ
	T1	Tumor ≤20 mm
	T2	Tumor > 20 mm, pero ≤50 mm
	T3	Tumor > 50 mm
	T4	Tumor de cualquier tamaño con extensión a pared torácica y/o piel
N(Afectación ganglionar)	NX	Los ganglios regionales no pueden ser evaluados
	N0	No metástasis en ganglios regionales
	N1	Micrometástasis o metástasis en 1-3 ganglios axilares y/o de la mamaria interna
	N2	Metástasis en 4-9 ganglios axilares o en la mamaria interna
	N3	Metástasis en ≥10 ganglios axilares, mamaria interna o infraclaviculares
M (Metástasis)	M0	No evidencia de metástasis a distancia
	M1	Evidencia de metástasis a distancia



La combinación de las subcategorías T, N y M definen cinco estadios que son designados como 0, I, II, III, IV, con sus subgrupos (IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB, IIIC ) en orden ascendente de gravedad.

### **1.5. FACTORES PRONÓSTICOS Y PREDICTIVOS**

Se define como factor pronóstico aquella variable (clínica, histológica, biológica, molecular) que proporciona información sobre la historia natural y la evolución de la enfermedad sin tratamiento y sirve para calcular la supervivencia y la probabilidad de recaída en ausencia de tratamiento.

Un factor predictivo informa sobre la probabilidad de respuesta o resistencia tumoral a un tratamiento concreto. Algunos factores predictivos pueden ser considerados como pronósticos, ya que su expresión también determina en alguna medida la agresividad biológica del tumor. Gracias a estos factores, podemos seleccionar la mejor opción terapéutica para cada paciente, evitando tanto el sobre como el infratratamiento.

Un factor pronóstico debe tener un valor predictivo significativo e independiente, validado en ensayos clínicos. Su determinación ha de ser sencilla, reproducible, asequible para la mayoría de los pacientes y debe someterse a controles de calidad que garanticen su valor. Además, debe ser fácilmente interpretable por el clínico y tener implicaciones terapéuticas.

Los parámetros histopatológicos clásicos (estado de los ganglios linfáticos, tamaño del tumor, tipo histológico y grado de diferenciación) son variables que continúan estando plenamente vigentes, junto con la presencia o no de metástasis a distancia que se recogen en la clasificación TNM. En los últimos años, el estudio de los perfiles genómicos en el CM permite identificar pacientes de bajo riesgo no subsidiarias de tratamiento con quimioterapia adyuvante.

Dentro de los factores pronósticos podemos distinguir los dependientes del paciente y los dependientes del tumor, algunos de los cuales son a su vez factores predictivos (42).

### 1.5.1. Factores pronósticos dependientes del paciente

**Edad:** El análisis multivariante siempre ha confirmado la edad como un factor pronóstico desfavorable independiente, aunque en estudios recientes que incluyen clasificaciones con firmas genéticas, no se confirma como factor independiente. Pese a ello, en la práctica clínica se sigue considerando la edad como variable pronóstica, para evaluar el riesgo de recaída y la necesidad o no de un tratamiento adyuvante. Las pacientes menores de 35 años tienen un peor pronóstico que las de mayor edad. Biológicamente este pronóstico desfavorable se explica por la existencia de un número más elevado de tumores pobremente diferenciados y con un grado de proliferación mayor (43).

**Raza:** Diversos estudios apoyan la diferencia racial en la supervivencia al CM. Las mujeres afroamericanas con tumores tipo Luminal A tienen un 76% más de probabilidades de morir y un 56% si se trata de un tumor tipo Luminal B. Sin embargo, no se observaron diferencias para los tumores HER2 amplificados ni en los Triple Negativo (TN). Las mujeres asiáticas e hispanas tienen menos probabilidades de morir como resultado del CM en comparación con las mujeres caucásicas (44).

### 1.5.2. Factores pronósticos dependientes del tumor

**Afectación axilar:** La presencia de metástasis en los ganglios axilares es uno de los factores pronósticos independiente más importante en el CM. En las pacientes en las que no existe afectación metastásica ganglionar en el momento del diagnóstico, la probabilidad de supervivencia a los 10 años de la cirugía se sitúa en torno al 90%, mientras que cuando hay afectación ganglionar, el riesgo de muerte se multiplica por un factor de 4 a 8.

El número de ganglios afectados también es un factor pronóstico, a mayor número de ganglios metastásicos, peor supervivencia (4). Hay estudios que demuestran que, cuando existen 4 o menos ganglios afectados, la tasa de supervivencia global a los 5 años se sitúa en torno al 80%; si la afectación ganglionar es superior a 4, dicha tasa desciende al 57% y es inferior al 20% a los 10 años si los ganglios afectados son más de 10 (24). Sin embargo, en los últimos años estos resultados han ido mejorando gracias al empleo de mejores esquemas de quimioterapia y de radioterapia asociados (45).

**Tamaño del tumor (T):** Es un factor pronóstico independiente de los ganglios. Se define como el diámetro máximo del tumor expresado en milímetros. Aunque ambos parámetros (tamaño tumoral y estado de los ganglios) están fuertemente relacionados, los resultados obtenidos por el Instituto Nacional del Cáncer en Estados Unidos concluyen que el tamaño del tumor es un factor pronóstico independiente, con influencia mayor en las pacientes con ganglios positivos que negativos, pero significativa en los dos grupo (46) . Por tanto, se puede decir, que a medida que aumenta el tamaño tumoral disminuye la supervivencia. Sin embargo, debemos tener en cuenta que algunos subtipos de cáncer se comportan de forma agresiva pese a tener un tamaño pequeño, por lo que este no debe ser considerado como un factor único a la hora de plantearse un tratamiento (47).

**Tipo histológico:** Aunque no todos los autores consideran el tipo histológico como un factor pronóstico independiente, otros investigadores defienden su valor. Los tipos histológicos más frecuentes son el carcinoma ductal invasivo "no especial" (NST), que representa el 80% de todos los cánceres de mama diagnosticados, y el carcinoma lobulillar invasivo que supone un 15%. El pronóstico de ambos es similar, pero existen otros tipos menos frecuentes que son de buen pronóstico como el tubular, el adenoide quístico, el medular, el apocrino y el cribiforme. Y también existen otros más agresivos como el lobulillar pleomórfico, el metaplásico, el micropapilar invasivo y el neuroendocrino de alto grado (48).

**Grado histológico (GH):** El grado tumoral tiene un valor pronóstico independiente en todas las etapas del CM, que se suma al tamaño tumoral y al estadio ganglionar, aunque la diferencia absoluta en la supervivencia entre grado bajo y alto parece aumentar según se incrementa el estado ganglionar (49) .

La OMS y el Colegio Americano de Patólogos (CAP) recomiendan utilizar la modificación de Nottingham para establecer el grado histológico tumoral, evaluando tres características: la formación de túbulos-diferenciación glandular, el pleomorfismo nuclear y el número de mitosis (Tabla 3 ) (50) (51). La concordancia entre los patólogos es muy alta cuando se siguen estrictamente estas recomendaciones y, además, se puede aplicar al tejido obtenido mediante BAG /BAV.

Tabla 3: Grado Histológico de Nottingham en CM.

CARACTERÍSTICAS	SCORE
<b>Formación de túbulos</b>	
>75%	1
10-75%	2
<10%	3
<b>Pleomorfismo nuclear</b>	
Uniformes, regulares y pequeños	1
Aumento moderado del tamaño y variabilidad	2
Marcada variación	3
<b>Contaje mitótico</b>	
Dependiente del área de campo del microscopio	1-3
SCORE FINAL	GRADO HISTOLÓGICO
3-5	Grado 1 (bien diferenciado)
6-7	Grado 2 (moderadamente diferenciado)
8-9	Grado 3 (poco diferenciado)

El grado histológico tiene una importancia clave en la selección de la terapia sistémica adyuvante por lo que continua siendo fundamental una correcta gradación (52).

**Invasión linfática y vascular (ILV):** La presencia de invasión vascular, en forma de pequeños émbolos tumorales vasculares o linfáticos en el tejido mamario normal adyacente al tumor, se asocia con mayor riesgo de desarrollar metástasis ganglionares. Además, se considera un factor pronóstico independiente que se relaciona con el tiempo libre de enfermedad y con la supervivencia (53). Aunque está demostrado su valor como factor pronóstico, los sistemas de estadificación internacionales como el TNM no lo incluyen como uno de los valores para tener en cuenta.

**Receptores hormonales:** La expresión de receptores hormonales en el CM, Receptores de Estrógenos (RE) y de Progesterona (RP), se considera un importante factor pronóstico y, fundamentalmente predictivo, de respuesta a la terapia hormonal. Aproximadamente el 70-75% de los CM invasivos expresan ambos, pero en el 10% de los casos solo expresan RE, presentando estos últimos un mayor riesgo de recurrencia que los casos que expresan tanto los RE como los RP. En menos del 5% de los CM se expresan sólo los RP, con un pronóstico similar al de las pacientes que expresan ambos

receptores hormonales. Aproximadamente el 30-40% de las pacientes con CM avanzado que expresan RE, tendrán una respuesta objetiva al tratamiento hormonal y un 20% adicional de pacientes logrará la estabilización de la enfermedad. Las pacientes con CM precoz que expresa RE, además de la respuesta a la terapia hormonal, presentan mayor tiempo libre de enfermedad y mejor pronóstico. La terapia hormonal es relativamente no tóxica, lo que justifica su uso en cualquier paciente con un tumor mamario que exprese RE.

Además, los tumores que expresan RE suelen asociarse a otros indicadores de pronóstico favorable, como el grado histológico bajo.

La determinación de los receptores hormonales se realiza mediante técnica inmunohistoquímica siguiendo la guía de las recomendaciones de la *American Society of Clinical Oncology* (ASCO) y del *College of American Pathologist* (CAP) (54).

Estos receptores no se expresan en los carcinomas apocrinos, medulares, metaplásicos y en más del 90% de los carcinomas poco diferenciados. La ausencia de expresión de receptores hormonales en tipos histológicos como el carcinoma tubular, mucinoso o lobular, o en tumores con grado histológico 1, podría considerarse como un falso negativo y, por tanto, siempre se debe considerar la confirmación del resultado. El punto de corte para interpretar un resultado como positivo es  $\geq 1\%$  de células con tinción nuclear, independientemente de la intensidad de la tinción, aunque la valoración debe incluir el porcentaje celular y la intensidad de la tinción. Diferentes estudios sugieren que la expresión baja de RP (1-10%) podría tener implicaciones de pronóstico negativo, por lo que se ha sugerido su inclusión como uno de los parámetros para distinguir el subtipo Luminal B (55).

El Receptor de Andrógenos (RA) se ha encontrado en la superficie de las células de CM en un 70 – 90 % de tumores RE y RP positivos, en el 60 % de los tumores HER2 positivos y en un 10-35 % de los tumores TN. El valor de la expresión de los RA como factor pronóstico-predictivo aún no está bien definido y por ello su estudio no se realiza en todos los CM (56). Su análisis se realiza especialmente en el subgrupo de tumores TN, pues aquellos que expresan RA podrían beneficiarse de los tratamientos que inhiben la vía de señalización de los RA (57) (58).

**Amplificación del gen *ERBB2* /Sobreexpresión de la proteína HER2:** Junto con los receptores hormonales, HER2 es el marcador pronóstico y predictivo más importante en el CM. Desde los primeros estudios realizados por Slamon en 1987, se sabe que los CM que sobreexpresan HER2 representan un subtipo biológicamente más agresivo (59) .

Hoy en día, el valor fundamental de HER2 es como factor predictivo de respuesta a terapias anti-HER2. En el año 1998 se aprobó el uso terapéutico de trastuzumab en pacientes con CM HER2 positivo, lo cual supuso una mejoría significativa en la supervivencia. La introducción de nuevas terapias dirigidas contra HER2, como lapatinib, pertuzumab y trastuzumab emtansina (T-DM1), esta última administrada sin necesidad de citostáticos simultáneos, subraya la importancia de identificar las pacientes con CM HER2 positivo (40) (60).

El gen *ERBB2* se localiza en el brazo largo del cromosoma 17, pertenece a la familia del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) y codifica una proteína-receptor tirosín quinasa transmembrana (HER2). Alrededor de un 10-20% de los CM tienen amplificado este gen y sobreexpresan la proteína. Se considera que existe sobreexpresión si se observa inmunotinción de membrana completa, circunferencial e intensa, en > 10% de las células tumorales (positividad 3+). En casos de resultado dudoso-equívoco (positividad 2+), se realiza el estudio mediante técnica de hibridación in situ (HIS). Para la interpretación de los resultados en inmunohistoquímica y en HIS se siguen las últimas recomendaciones de la ASCO/CAP (61) .

**Marcador de proliferación Ki-67:** La evaluación inmunohistoquímica de Ki-67 es el método más utilizado en la práctica clínica para determinar la actividad proliferativa del CM. Es un anticuerpo monoclonal que reacciona con un antígeno nuclear y sólo se detecta en las células en proliferación. Su síntesis se inicia en la fase G1 del ciclo celular y adquiere su máxima expresión al final de la fase S.

Su utilidad clínica se ha visto limitada por la escasa reproducibilidad entre observadores, las diferencias en la metodología de valoración (score) y los puntos de corte (62) (63).

Actualmente, según el consenso de St. Gallen (2013), en la práctica clínica, se recomienda el punto de corte del 20% para distinguir entre el CM tipo Luminal A y tipo Luminal B (64). Un metaanálisis reciente concluye que un nivel de Ki-67 superior al 25% está asociado a un peor pronóstico (65).

**Biopsia líquida y células tumorales circulantes:** La biopsia líquida se considera una prueba diagnóstica que permite, en términos generales, detectar Células Tumorales Circulantes (CTC) de origen epitelial y ADN tumoral circulante (ctDNA) en la sangre de pacientes con cáncer.

En estudios recientes se ha demostrado que las CTC son un factor pronóstico importante, tanto en el CM temprano como en el metastásico. Su presencia se considera un factor de riesgo individual para la recaída / muerte por CM, similar a los factores pronósticos clásicos (tamaño y grado tumoral, índice de proliferación o estado de los ganglios) que en la práctica diaria se tienen en cuenta para las decisiones terapéuticas. En la actualidad, no existe ninguna evidencia científica definitiva que respalde su utilidad clínica, pero existen numerosos ensayos en curso que podrían determinar su uso en un futuro próximo (66).

Actualmente, el ctDNA parece ser el mejor material para caracterizar las mutaciones génicas del cáncer. Algunos estudios han demostrado que su análisis, después de la cirugía o durante el seguimiento, proporciona información relevante en relación con la resistencia a la terapia y también como predictor de respuesta a tratamientos (67). Su potencial aplicación como método de detección precoz del cáncer precisa de una tecnología aún en investigación.

**p53:** Es una proteína codificada por el gen *TP53*, localizado en el brazo corto del cromosoma 17. El gen *TP53*, conocido como el "guardián del genoma", es un gen supresor de tumores que regula la progresión del ciclo celular, la reparación del ADN, la senescencia celular y la apoptosis. Por el contrario, el *TP53* mutado contribuye a la progresión del tumor a través de un mecanismo dual, la pérdida de la actividad de supresión del tumor y una ganancia de actividad oncogénica. Su papel en el CM como marcador pronóstico independiente sigue siendo controvertido. La frecuencia de mutaciones del *TP53* es del 11-12 % en los tumores tipo Luminal A, de un 24%-29 % en el tipo Luminal B, hasta el 70% en los HER2 positivos y de hasta un 89% en los TN (68) (69) (70).

En la literatura se describe que el CM tipo Luminal con sobreexpresión de p53 muestra un pronóstico significativamente peor en términos de tasas de supervivencia general y libre de enfermedad (71). Para otros autores, la sobreexpresión de p53 sólo es un factor de peor pronóstico en el subgrupo de pacientes con ganglios negativos (72).

**Bcl2** : La expresión de la proteína Bcl2 se ha relacionado con el CM (73) . La función principal de esta proteína es inhibir la muerte celular programada (apoptosis) y prolongar la supervivencia celular al detener las células en la fase  $G_0 / G_1$  del ciclo celular.

Esta proteína parece tener un papel pronóstico favorable en los tumores de mama, especialmente en el tipo Luminal A, con un efecto supresor tumoral más prominente que un efecto oncogénico, aunque el mecanismo biológico de este efecto sigue siendo en gran medida desconocido (74).

También, entre las pacientes que tienen afectación ganglionar, se ha observado que presentan una mejor supervivencia las que expresan Bcl2 que aquellas que no lo expresan (75).

**Infiltrado linfocitario tumoral:** Con la llegada a la práctica clínica de la inmunoterapia como tratamiento en algunos tumores, el estudio del infiltrado inflamatorio y de las células inmunes en el tumor y zona peritumoral ha adquirido un papel relevante como factor pronóstico. En los últimos años, se ha propuesto la evaluación morfológica de los TILs en el CM como un biomarcador potencialmente útil, dado el valor pronóstico observado en los tipos en el CM TN y HER2 positivo. Se ha descrito que cada incremento del 10% de los linfocitos del estroma intratumoral se asocia con una reducción del 18% del riesgo de muerte y que esta supervivencia mayor es independiente de la edad de las pacientes, del estado de los ganglios linfáticos, del GH, de la ILV y del índice de proliferación Ki-67. Además, parece existir una correlación positiva entre los TILs y la supervivencia general en todos los subgrupos analizados (76)(77).

La cuantificación de los TILs es factible en secciones de Hematoxilina-Eosina (HE) siguiendo las recomendaciones del *International TILs Working Group* (78).



**PDL-1:** Un mecanismo de supresión de la respuesta inmunitaria implicado en la progresión tumoral es la vía del PD-1 (receptor de la muerte celular programada). PD-1 es una proteína que se expresa en la superficie de las células inmunes y también en las células tumorales. Su ligando principal es PD-L1 y cuando se une a PD-1 se produce una señal inhibitoria de la respuesta inmune en los tejidos. La expresión de PD-L1 se ha demostrado en el CM, tanto en las células tumorales como en los linfocitos acompañantes (TILs); es mayor en tumores con características anatomopatológicas de peor pronóstico (mayor tamaño, GH alto, receptores hormonales negativos, afectación ganglionar) y en los tipos TN y HER2 (79). Estos tipos de CM parecen ser candidatos a tratamientos de inmunoterapia dirigidos al bloqueo de la vía PD-1/PD-L1, ya que se ha demostrado una respuesta clínica duradera (80).

### 1.5.3. Clasificación molecular

El CM es una enfermedad compleja que incluye entidades clínicas, morfológicas y moleculares muy diferentes. Su heterogeneidad no se explica únicamente con parámetros clínico-patológicos (edad, tamaño del tumor, GH, afectación ganglionar) y biomarcadores (RE, RP y HER2). Esto es algo reconocido por los clínicos y patólogos desde hace mucho tiempo y durante los últimos 20 años se ha constatado de una forma más clara al haberse profundizado en el análisis de su “maquinaria molecular”.

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

El grupo de Perou, en el año 2000, fue el primero en clasificar molecularmente el CM. Evaluaron 65 casos de CM e identificaron un conjunto de 496 genes que presentaron mayor variabilidad en cuanto a su expresión entre los distintos grupos de tumores, pero con mínima variación en las muestras de una misma paciente, definiendo así una lista de genes “intrínsecos” y caracterizando cuatro tipos moleculares de CM (Luminal, HER2, Basal y “Normal-like”), aunque en la práctica clínica el denominado “Normal like” no se utiliza pues sobreexpresa genes propios de las células mioepiteliales de la mama normal (39).

Los mismos investigadores, en un estudio posterior con un número mayor de pacientes, concluyeron que el grupo Luminal podía dividirse en, al menos, dos grupos (Luminal A y B) y que los diferentes tipos moleculares se asociaban a diferente pronóstico (81).

La clasificación molecular, tanto en tumor primario como en metástasis, ha mostrado diferencias significativas en términos de incidencia, factores de riesgo, pronóstico y sensibilidad al tratamiento; contribuyendo de manera muy importante tanto en el conocimiento de la biología del CM como en la toma de decisiones terapéuticas.

Los tipos moleculares que distinguimos y a los que hoy en día se hace referencia son:

**Tipo Luminal:** Constituye alrededor del 75- 80% de los CM. Se caracteriza por la alta expresión de genes asociados a las células epiteliales lumbales del ducto mamario y corresponden a los tumores RE positivos. Este patrón incluye la expresión de citoqueratinas de bajo peso molecular (8 y 18), RE y genes relacionados con la activación de RE (*LIVI* y *GATA 3*) y menos de un 20 % tienen mutaciones en el gen *TP53*. En la actualidad, dentro de este tipo se distinguen dos subgrupos diferenciados:

- **Subtipo Luminal A:** Son los tumores de mama más frecuentes (50-60%), presentan alta expresión de RE y de genes relacionados con RE, índice de proliferación Ki-67 bajo y ausencia de sobreexpresión de HER2. Estos tumores generalmente muestran un GH bajo y tienen un pronóstico excelente.
- **Subtipo Luminal B:** Representan un 10-20% de los CM. Presentan una moderada expresión de RE, una expresión menor de genes relacionados con RE, variable expresión de HER2, índice de proliferación Ki-67 alto y mayor frecuencia de mutaciones en el gen *TP53*. Suelen presentar un fenotipo más agresivo, GH mayor, un índice proliferativo más elevado y tienen un pronóstico significativamente peor que los Lumbales A (82). Como se demuestra en diferentes estudios son tumores quimio-resistentes y relativamente resistentes a la hormonoterapia (83).

**Tipo HER2:** Constituyen el 10-15% de los CM. Estos tumores se asocian a una baja expresión de genes relacionados con RE, muestran una elevada expresión del gen *HER2*, genes asociados a la vía HER2, índice de proliferación alto y entre un 40-80% presentan mutaciones del gen *TP53*. Este subtipo comprende sólo la mitad de los CM con sobreexpresión HER2; el resto corresponden al subtipo Luminal B que expresa RE. Morfológicamente son tumores con un GH alto. Desde el punto de vista clínico se caracterizan por un mal pronóstico, aunque su historia natural adversa se ha visto modificada en los últimos años por los avances terapéuticos de las terapias diana anti-HER2 (60) (84).

**Tipo TN o “Basal-like”:** Representan el 10-15% de los CM. Reciben este nombre porque las células neoplásicas de estos tumores expresan genes que habitualmente se encuentran en las células basales y células mioepiteliales de los ductos mamarios. Se caracterizan por la baja expresión de genes luminales y genes relacionados con HER2. Se denominan “Triple Negativo” porque, desde el punto de vista inmunohistoquímico no expresan receptores hormonales ni sobreexpresan HER2. Presentan un índice alto de mutaciones en el gen *TP53* y expresan citoqueratinas de alto peso molecular (5, 14 y 17) y EGFR. Los carcinomas TN suelen ser de GH alto, tienen un índice mitótico elevado y con frecuencia presentan necrosis e infiltrado linfocitario prominente asociado. A pesar de que muestran una tasa de respuesta elevada a los esquemas de tratamiento quimioterápico, son tumores con un pronóstico peor (85). Aunque la mayoría de los tumores de este grupo son esporádicos, es el tipo más frecuente de CM en pacientes portadoras de la mutación *BRCA1* (80%) (86).

En los últimos estudios publicados se diferencian cuatro subtipos de CM TN (87) (88) :

- **Subtipo “Basal-like”:** Se caracteriza por la sobreactivación de las vías biológicas responsables del ciclo celular y la respuesta al daño del ADN y, consecuentemente, por una proliferación celular acelerada.
- **Subtipo Mesenquimal o “Claudin-low”:** Presentan alteraciones de los genes implicados en la motilidad celular, interacción extracelular con la matriz/transición epitelio- mesénquima y respuesta a factores de crecimiento. Más

del 50% de los tumores de este subtipo se corresponden histológicamente con un carcinoma metaplásico.

- **Subtipo Inmuno-activado:** Se caracteriza por activación de genes relacionados con los procesos inmunes. Están activadas vías de señalización de células B, T, Natural Killer y dendríticas, así como la vía de señalización responsable de presentación de antígenos. En este subtipo se incluye el carcinoma medular que tiene mejor pronóstico que el resto de los tumores TN.
- **Subtipo Luminal RA:** Es el que presenta características más diferenciales, con alteración de las vías de regulación hormonal de estrógenos/andrógenos distinta a otros subtipos.

En la práctica clínica habitual se utiliza una clasificación clínico-patológica subrogada basada en los resultados de la inmunohistoquímica y la HIS. Así, se utiliza la expresión de RE y RP, HER2 y el valor del índice de proliferación Ki- 67 (Tabla 4) (89).

**Tabla 4: Clasificación molecular/clínico-patológica subrogada.**

CLASIFICACIÓN MOLECULAR	CLASIFICACIÓN PATOLÓGICA SUBROGADA
Luminal A	<b>Luminal A-like</b>
	RE y RP positivos HER2 negativo Ki-67 bajo (<20%)
Luminal B	<b>Luminal B-like (HER2 positivo)</b>
	RE positivo HER2 sobreexpresado/amplificado Cualquier Ki-67 Cualquier RP
	<b>Luminal B-Like (HER2 negativo)</b>
	RE positivo HER2 negativo Ki-67 alto (>20%) RP negativo o bajo
HER2-enriquecido	<b>HER2 positivo (no luminal)</b>
	RE y RP negativos HER2 sobreexpresado/amplificado
Basal-like	<b>Triple Negativo</b>
	RE y RP negativos HER2 negativo

#### 1.5.4. Perfiles génicos pronósticos

Actualmente el 80% de los tumores de mama se diagnostican en estadios iniciales, con un tamaño inferior a 2 cm y con uno o ningún ganglio axilar afectado, siendo necesario recurrir a otros parámetros para poder estimar el pronóstico con más exactitud y aplicar una terapia más personalizada. En la actualidad disponemos de herramientas que analizan la expresión simultánea de cierto número de genes en la pieza tumoral, son los llamados perfiles génicos o paneles multigénicos. Estas plataformas génicas permiten identificar las pacientes con alto riesgo de recurrencia a distancia que probablemente se beneficien de la quimioterapia adyuvante y las pacientes con bajo riesgo de recurrencia a distancia, en las que se evitaría el tratamiento de quimioterapia y sus efectos secundarios(90)(91).

En la actualidad hay cuatro plataformas disponibles que difieren sustancialmente en la metodología utilizada para cuantificar la expresión génica, los genes probados, las variables clínicas y patológicas incluidas y la estratificación del grupo de riesgo.

##### **MammaPrint®**

Incluye 70 genes. Se desarrolló mediante matrices de ADN, requiriendo tejido congelado, pero actualmente puede realizarse a partir de muestras tisulares incluidas en parafina (92).

La plataforma ha sido validada en varios estudios y proporciona información pronóstica de la supervivencia sin enfermedad a distancia, independientemente de los criterios clínico-patológicos clásicos, en tumores receptores dependientes sin afectación ganglionar (93)(94).

Esta plataforma nos ofrece un resultado dicotómico: riesgo de recaída a distancia alto o bajo (95).

En el grupo de riesgo bajo, las pacientes tienen un riesgo de recaída a distancia inferior al 10% sin tratamiento quimioterápico adyuvante, con lo cual se admite que pueden prescindir de dicho tratamiento. Nuevos estudios están aportando datos sobre su utilidad también en pacientes con CM con 1 a 3 ganglios afectos, en tumores de bajo

riesgo y en tumores que sobreexpresan HER2. Esta plataforma tiene valor pronóstico ya que estima la supervivencia sin metástasis a distancia a los 10 años (96) (97).

El ensayo MINDACT (*Microarray in node 0-3 positive Disease may Avoid Chemotherapy*) fue un estudio multicéntrico, prospectivo, aleatorizado, de fase III, con más de 6.000 pacientes. Demostró que, en 1.550 casos de riesgo clínico alto y con riesgo genómico bajo, la supervivencia sin metástasis a 5 años fue del 94,7 % (IC 92,5-96,2). Esto indicaba que aproximadamente el 46% de los casos de riesgo clínico alto podrían no necesitar quimioterapia (nivel de evidencia IA) (98)(99).

MammaPrint<sup>®</sup> no se utiliza en la categoría de riesgo bajo ni en pacientes con CM TN o con sobreexpresión de HER2.

### **Oncotype DX<sup>®</sup>**

Incluye 21 genes (16 genes relacionados con el cáncer y 5 genes de referencia) y se realiza mediante PCR a partir de tejido incluido en parafina. Permite calcular una puntuación de riesgo de recaída, categorizando las pacientes en tres grupos de riesgo: riesgo bajo con una tasa de recaída a distancia a los 10 años del 7%, del 14% en el grupo de riesgo intermedio y del 30 % en el de riesgo alto (100) (101).

TAILORx fue un ensayo prospectivo diseñado para determinar el pronóstico de un grupo de pacientes que se habían sometido a cirugía por CM (receptores hormonales positivos, HER2 negativo y con ganglios negativos). En este estudio se concluyó que el riesgo de recurrencia a distancia era del 0,7% y el riesgo de cualquier otra recurrencia del 1,3%. Por lo tanto, se podía evitar la quimioterapia adyuvante y plantear sólo hormonoterapia para los casos con una expresión génica favorable (102) (103).

Esta plataforma también se aplicó en tumores sensibles a hormonas con afectación ganglionar axilar. Todas las pacientes recibieron terapia hormonal con tamoxifeno y, como en el estudio anterior, la quimioterapia se evitaría cuando el índice de riesgo fuera bajo. En el grupo de riesgo intermedio no se demostró beneficio al añadir quimioterapia al tratamiento endocrino (104).

En la actualidad se considera que esta plataforma es la que posee la mayor validación biológica y su uso está incluido en la mayor parte de las guías internacionales, aunque la ASCO recomienda el uso de Oncotype para decidir el tratamiento con quimioterapia adyuvante solo en casos sin afectación ganglionar.

### **EndoPredict®**

Mide niveles de expresión de ARN de 8 genes de cáncer, 3 del ciclo de proliferación celular y 5 de señalización hormonal; 3 genes de referencia para la estandarización y 1 para medir el ADN genómico. Se realiza mediante PCR a partir de tejido incluido en parafina y está validado tanto en muestras quirúrgicas como de BAG. Presenta la ventaja que puede implementarse de forma descentralizada, sin necesidad de remitir a laboratorios especializados.

Es un test de segunda generación, diseñado para calcular el riesgo de metástasis a distancia en el CM receptores hormonales positivos / HER2 negativo, identificando un subgrupo de pacientes que tienen un pronóstico excelente si se tratan con terapia endocrina exclusivamente. Los niveles relativos de expresión génica se usan para calcular un índice de riesgo molecular EndoPredict (índice EP) que varía de 0 a 15 ( $\leq 5$  riesgo bajo y  $>5$  riesgo alto). Esta plataforma aporta un resultado dicotómico (buen o mal pronóstico). Además, la combinación de dos variables clínico-patológicas (tamaño del tumor y estado ganglionar) con el índice EP permite establecer un índice EP clínico (EPclin) más preciso, que define dos categorías basadas en el riesgo de recurrencia a 10 años: riesgo bajo (índice  $<3.4$ ; riesgo general de 6–8%) y riesgo alto (índice  $> 3.4$ ; riesgo general de 15– 22%) (105)(106).

En un estudio realizado por el Grupo Español de Investigación de Cáncer de Mama (GEICAM), en mujeres con ganglios positivos tratados con terapia hormonal y quimioterapia adyuvante, se concluyó que, en el grupo de riesgo bajo basado en EPclin, se podría no extender la terapia endocrina más allá de 5 años; y que las pacientes de riesgo bajo con el índice EP podrían recibir un tratamiento suficiente con quimioterapia estándar (nivel de evidencia IB para el pronóstico) (107) .

### **Test PAM50/ Prosigna**

Esta prueba mide la expresión de 50 genes que pueden analizarse a partir del ARN obtenido de tejidos fijados con formol e incluidos en parafina. Fue implementada por el profesor Perou y cols. (2009) demostrando que, con sólo 50 genes, la correlación con los subtipos moleculares que él había descrito en el año 2000, era del 93%. Esta determinación se puede realizar en laboratorios locales, asegurando la reproducibilidad del método.

Esta plataforma proporciona información sobre el subtipo de tumor y analiza la expresión de 18 genes de proliferación. Con estos datos y el tamaño tumoral (< 2cm o > 2cm), se obtiene un índice pronóstico conocido como “Risk of Recurrence” (ROR), que determina el riesgo de recidiva a distancia a 10 años, distinto según exista o no afectación axila(108).

La validez clínica de Prosigna<sup>®</sup> ha sido probada en varios estudios que han demostrado que la puntuación ROR proporciona información pronóstica adicional a la de las variables clínicas y patológicas estándar y sobre la recurrencia después de 10 años de terapia hormonal (109)(110)(111).

### **Secuenciación de nueva generación**

El desarrollo reciente de ensayos centrados en el análisis de las alteraciones en la metilación del ADN, la expresión de microARN y la expresión de determinadas proteínas, son una herramienta de investigación para mejorar la caracterización molecular del CM. Diferentes estudios de secuenciación de nueva generación (NGS) han demostrado que los genes mutados con mayor frecuencia en el CM son *PIK3CA* (31–41%), *TP53* (30–36%), *KTMC2* (7–11%), *GATA3* (10–11%), *MAP3K1* (7–10%) y *CDH1* (10–11%), que las mutaciones *MAP3K1 / TP53*, *GATA3 / TP53*, *CDH1 / TP53* y *CDH1 / GATA3* son mutuamente excluyentes y que con frecuencia existen mutaciones concomitantes de *MAP3K1 / PIK3CA* y *CDH1 / PIK3CA* (112) (68) (113) (114).



### 1.5.5. Índices pronósticos

Aunque las plataformas genómicas son estudios de “última generación” cada vez más extendidas a nivel asistencial, los índices pronósticos son herramientas al alcance de todos que siguen ayudando en la toma de decisiones terapéuticas.

Los índices pronósticos funcionan como “calculadoras” que combinan los factores pronósticos principales y clásicos (estado ganglionar, tamaño del tumor, GH, expresión de receptores hormonales y HER2) para ofrecer una estimación del riesgo de recaída.

Uno de ellos es el **Índice de Nottingham (NPI)**, que se calcula teniendo en cuenta el tamaño del tumor, el GH y el estado de los ganglios linfáticos, según la siguiente fórmula:

$$\text{NPI: } 0,2 \times \text{tamaño tumoral (cm)} + \text{estadío de los ganglios (1,2,3)} + \text{GH (1,2,3)}$$

El valor más bajo el NPI tiene el mejor pronóstico.

Su importancia se mantiene vigente, siendo un factor pronóstico de gran trascendencia, ligado a la supervivencia libre de enfermedad y a la supervivencia global (115).

Otro muy utilizado es el “**Adjuvant Online**”, una aplicación disponible en Internet, de acceso gratuito. Para el cálculo se tiene en cuenta la edad, el tamaño tumoral, el número de ganglios afectados, el GH y la expresión de receptores hormonales. Con este índice se estima la probabilidad de recaída y de supervivencia, con y sin tratamiento adyuvante, tanto quimioterápico como hormonal. Cuando el riesgo de recaída no alcanza el 5%, no se recomienda la administración de quimioterapia adyuvante (116).

## 1.6. TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE MAMA

El enfoque terapéutico frente al CM ha cambiado a medida que ha ido avanzando el conocimiento de la enfermedad. Inicialmente se trataba como una

enfermedad locorregional, que implicaba tratamientos locales muy agresivos, pero en la década de los 70 se acepta el concepto de los hermanos Fisher: "nos encontramos ante una enfermedad sistémica con una alta capacidad de producir metástasis a distancia desde el inicio y que, por lo tanto, requiere un tratamiento multidisciplinar". Así pues, en el tratamiento del CM debemos contar con la cirugía y la radioterapia para el tratamiento locorregional y con diferentes tratamientos sistémicos para evitar y tratar la enfermedad metastásica.

### 1.6.1. Tratamiento quirúrgico

A la hora de hablar de la cirugía del CM hay que distinguir entre la cirugía de la mama y la de la axila. La intencionalidad de la cirugía siempre debe ser el control locorregional de la enfermedad con el mejor resultado estético posible.

Hasta finales del siglo XIX, el diagnóstico del CM se realizaba en estadios avanzados y la finalidad de la cirugía era paliativa. En 1882, William Halsted estableció unas pautas quirúrgicas con extirpación de la glándula mamaria junto con los pectorales mayor y menor y las regiones ganglionares. Se trataba de una cirugía muy mutilante y asociada a una importante morbilidad, pero por primera vez se podía hablar de supervivencia y reducción de la recurrencia local, por lo que la operación de Halsted permaneció con pequeñas variaciones hasta los años 70 (1). En esta década, gracias a los avances terapéuticos y en las técnicas de imagen y a la mayor concienciación de las mujeres, los tumores se diagnostican en estadios más iniciales y se comienzan a realizar cirugías conservadoras de la mama, aunque se mantiene la misma cirugía radical a nivel axilar. Los trabajos de Veronesi (1981) y de Fischer (1989) demostraron que la cirugía conservadora de la mama asociada a radioterapia no presentaba diferencias significativas con la mastectomía de Halsted y sus leves variaciones, en términos de recurrencia local, supervivencia libre de enfermedad o supervivencia global. A partir de estos resultados, la mastectomía empieza a considerarse una mutilación innecesaria en pacientes con CM de un tamaño inferior a 2 cm en los primeros trabajos de Veronesi (2) (117) y por debajo de 4 cm en los trabajos de Fischer (3).

En 1991, el *National Institutes of Health Consensus Conference*, admite la cirugía conservadora como tratamiento del CM. El objetivo del tratamiento sigue siendo el mismo, obtener el máximo control de la enfermedad, la máxima información oncológica y un buen resultado estético. Está indicada en tumores inferiores a 5 cm, independientemente del estado ganglionar y siempre se deben obtener márgenes negativos, independientemente del subtipo molecular (118)(119).

La cirugía conservadora está contraindicada en microcalcificaciones sospechosas extensas, márgenes afectos tras repetidas resecciones, paciente gestante que requiera radioterapia durante el embarazo, imposibilidad técnica de realizar tratamiento radioterápico o negativa de la paciente a realizarlo y en el carcinoma inflamatorio. Además, se consideran contraindicaciones relativas la radioterapia previa en la mama o en el tórax y la enfermedad activa del tejido conectivo que afecte a la piel. La enfermedad multicéntrica (2 o más tumores en cuadrantes separados) y las localizaciones tumorales que están asociadas a un mal resultado estético (tumores en cuadrantes internos), son una contraindicación relativa, gracias a las técnicas oncoplásticas, se pueden realizar resecciones tumorales con un mínimo impacto en el contorno de la mama, permitiendo aumentar el número de cirugías conservadoras (120)(121).

Paradójicamente, cuando las técnicas oncoplásticas están más desarrolladas, la técnica quirúrgica actual precisa de un volumen menor de exéresis de tejido, modificando menos el contorno mamario y con abordajes de mínima visibilidad para procedimientos de remodelación mamaria. Esta mejoría en la técnica quirúrgica está relacionada con el incremento de lesiones subclínicas gracias a los programas de cribado, con el mayor ajuste de los márgenes libres en las tumorectomías y con el aumento de los tratamientos neoadyuvantes que consiguen, en ciertos casos, respuestas completas.

A pesar del avance que ha supuesto una cirugía conservadora en el CM, la mastectomía continúa teniendo sus indicaciones, aunque también ha sufrido modificaciones desde la técnica de Halsted. Así, se respeta los músculos pectoral mayor y menor, se realizan mastectomías "ahorradoras" de piel, se puede conservar el complejo areola pezón y se realizan reconstrucciones en el mismo acto quirúrgico en pacientes

seleccionadas, con tasas de recidiva local y supervivencia libre de enfermedad comparables a las de la técnica clásica (122)(123)(124).

## **TRATAMIENTO QUIRÚRGICO DE LA AXILA**

La cirugía axilar en el CM tiene como objetivo el control local de la enfermedad y la estadificación del tumor, ya que el estado de los ganglios axilares constituye uno de los factores pronósticos más importantes en el CM y debe tenerse en cuenta para planificar la correcta estrategia terapéutica.

Durante la mayor parte del siglo XX, la LA se consideró el tratamiento quirúrgico estándar. La LA no está exenta de morbilidad precoz, como el síndrome de red axilar y limitación de la movilidad de la articulación gleno-humeral, y tardía con la aparición del linfedema (125). En los años 90, la realización de cirugías más conservadoras a nivel del CM se seguía acompañando de LA y en muchos casos no se objetivaba afectación de los ganglios. El conocimiento de la diseminación “ordenada” del CM a través del sistema linfático, fue el inicio de los estudios que permitieron identificar el primer ganglio linfático que recibe el drenaje del tumor y, posteriormente, el desarrollo de la técnica de la BSGC que hoy en día es el gold estandar de la cirugía axilar (5).

### **1.6.2. Tratamiento locorregional radioterápico**

La irradiación complementaria en el CM tiene como objetivo aumentar el control locorregional y mejorar la supervivencia. Este tratamiento tiene sus indicaciones tanto en la cirugía conservadora de la mama como tras la mastectomía. El embarazo y la imposibilidad técnica de realizar el tratamiento son una contraindicación absoluta para la irradiación. La irradiación previa en el área a tratar, antecedentes de conectivopatías, esclerodermia, lupus diseminado, artritis reumatoide y cardiopatía severa en CM izquierdo, son contraindicaciones relativas que precisan de valoración individualizada (126) (127) .

El esquema clásicamente utilizado es la aplicación de radioterapia externa sobre la mama afecta hasta alcanzar una dosis de 45- 50 Gy y con una sobreimpresión o “boost” sobre el lecho quirúrgico. En los últimos años se están aplicando otros esquemas como el hipofraccionamiento, aumentando la dosis por fracción con una disminución del tiempo total de tratamiento. La radioterapia no está exenta de efectos secundarios a nivel local y reducir la dosis en los tejidos sanos circundantes al tumor es una prioridad en cualquiera de las técnicas empleadas. Desde el año 2005 cada vez se usan más las técnicas de irradiación parcial de la mama (*Partial Breast Irradiation: PBI*). Estos esquemas permiten un tratamiento más rápido que no interfiere en la vida cotidiana, incrementando la calidad de vida de las pacientes y disminuyendo los costes de la irradiación en el tratamiento conservador (128)(129). Las técnicas de irradiación parcial que se pueden aplicar en el CM son: irradiación externa parcial, braquiterapia postoperatoria multicatéter, braquiterapia y técnicas perioperatorias, irradiación intraoperatoria (RIO) con aceleradores de electrones y de fotones de baja energía.

Los criterios de irradiación de las áreas ganglionares son independientes del tipo de cirugía de la mama, dependen del tipo de cirugía axilar realizada, así como del resultado anatomopatológico de la LA. La irradiación de los niveles I y II está indicada si se resecan menos de 10 ganglios o existe una enfermedad extraganglionar importante y en los casos de GC con macrometástasis en los que no se realiza LA. La irradiación de los niveles III y IV axilar y fosa supraclavicular y cervicales inferiores se realiza si, tras LA, hay ganglios afectados o enfermedad extraganglionar.

La irradiación de la axila no está exenta de toxicidad. El linfedema también aparece tras la radioterapia axilar, aunque su incidencia y severidad están relacionados con la extensión de la disección axilar, la radioterapia y la radiodermatitis en la región axilar, variando su incidencia entre un 5 a un 25%. Otra complicación es la plexopatía braquial, rara (<0,5%) pero grave. Su aparición está en relación con la irradiación de los ganglios supraclaviculares (130).

### 1.6.3. Tratamiento sistémico

El objetivo del tratamiento sistémico es lograr la erradicación de la enfermedad micrometastásica, que potencialmente puede estar presente en todas las pacientes con CM infiltrante, responsable en último término de la recaída y muerte de la paciente por la progresión de la enfermedad.

Para valorar la necesidad de tratamiento sistémico, se estima el riesgo de recaída de la enfermedad en base a herramientas clínicas y los factores pronósticos clásicos como la afectación ganglionar, el tamaño tumoral y el GH. La nueva clasificación molecular y la existencia de plataformas genómicas (pronósticas y predictivas) son herramientas que también se utilizan para decidir el tipo de tratamiento sistémico.

El CM es una de las primeras neoplasias malignas en las que un tratamiento “dirigido” se ha utilizado con éxito. Un ejemplo de ello son las terapias endocrinas en tumores hormonodependientes y los agentes antiHER2 que han revolucionado la forma en que se trata el CM HER2 positivo.

#### **HORMONOTERAPIA**

La terapia endocrina ha sido, desde finales de los años 60 del siglo XX, la piedra angular del enfoque de la terapia sistémica para el CM con receptores hormonales positivos. El tratamiento hormonal tiene como objetivo que los estrógenos circulantes dejen de estimular el crecimiento tumoral, bien bloqueando la unión del estrógeno a su receptor (tamoxifeno) o disminuyendo su producción (supresión ovárica en mujeres premenopáusicas e inhibidores de la aromatasa en postmenopáusicas) (131).

La administración de hormonoterapia adyuvante reduce de manera significativa la recidiva y muerte en pacientes con CM hormonosensible.

#### **QUIMIOTERAPIA**

Existe una clara evidencia que la Quimioterapia (QT) reduce de manera significativa la recidiva y muerte de pacientes con CM infiltrante. En pacientes con

tumores que no expresan receptores hormonales, la opción estándar es el tratamiento con QT, tanto en los TN como en los HER2 positivos. Las pacientes con tumores en estadio inicial, receptores hormonales positivos y HER2 negativo constituyen un grupo en el que la decisión de administrar o no QT adyuvante es más compleja. Las combinaciones basadas en antraciclinas y taxanos son los pilares fundamentales de los esquemas quimioterápicos (132).

## **TRATAMIENTO BIOLÓGICO**

En el año 1989 se descubrió la sobreexpresión de HER2 en el CM, presente en aproximadamente un 10- 20% de los tumores de mama y constituyendo un subgrupo con mayor agresividad y peor pronóstico. Numerosos estudios han facilitado el desarrollo de múltiples agentes antiHER2 que han revolucionado la forma en que se trata el CM HER2 positivo, reduciendo de manera significativa el riesgo de recidiva y muerte (133)(134).

Los diferentes esquemas de tratamiento sistémico se pueden indicar tras la cirugía como tratamiento adyuvante o bien previamente a la cirugía como tratamiento neoadyuvante o QT primaria. En los casos en que está indicada la neoadyuvancia, ésta no muestra diferencias significativas en términos de supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global con la QT adyuvante. La neoadyuvancia nos permite aumentar los tratamientos quirúrgicos conservadores y reduce la tasa de ganglios axilares metastásicos. La respuesta al tratamiento sistémico primario es, además, un factor pronóstico, ya que las mujeres en las que la respuesta patológica es completa tienen mayor supervivencia que las que no responden, especialmente en los casos de tumores TN y en los HER2 positivo. Para el tratamiento neoadyuvante son válidos los mismos esquemas de QT que en el tratamiento adyuvante, con antraciclinas y taxanos (135).

### **1.7. COMORBILIDAD ASOCIADA AL TRATAMIENTO LOCALREGIONAL AXILAR**

Existen numerosos efectos secundarios en relación con el tratamiento a nivel axilar, tanto con la cirugía como con la radioterapia, por lo que es muy importante definir cuidadosamente la indicación del tratamiento localregional a nivel axilar.

En el acto quirúrgico se pueden producir lesiones fundamentalmente nerviosas, con aparición de parestesias y a veces afectación del paquete vasculonervioso del músculo dorsal ancho.

El seroma se produce en el postoperatorio inmediato. Es una acumulación anormal de líquido en el espacio "muerto" de la axila, que se describe en la literatura con un amplio rango de incidencia (3-85%), siendo una fuente de morbilidad e incomodidad significativas (136).

El linfedema es uno de los efectos secundarios más desoladores y subestimados del tratamiento del CM, con consecuencias en el bienestar físico, psicológico y emocional de la mujer. Se produce por una interrupción adquirida del sistema linfático axilar después del tratamiento locorregional (radioterapia y / o disección de ganglios linfáticos) y como consecuencia existe una acumulación crónica de líquido rico en proteínas en los tejidos blandos con un aumento del perímetro de la extremidad (aumento de hasta al menos 2 cm a diferentes niveles), que puede provocar dolor, disminución de la función, alteración de la imagen corporal y ansiedad (Figura 1).



**Figura 1:** Linfedema en extremidad superior izquierda.



El tratamiento para el linfedema es limitado y dirigido fundamentalmente a prevenir la progresión de la enfermedad. Los síntomas pueden tener un inicio tardío y los criterios para definirlo son variables. Por ello, la incidencia registrada oscila entre un 5% a un 50% después del tratamiento del CM. Su desarrollo es impredecible, pudiendo aparecer años después de la cirugía axilar, aunque algunos estudios indican que en el 90% de los casos se produce en los tres primeros años tras el tratamiento(137)(138)(139).

Son muchos los estudios que describen el efecto negativo que el linfedema provoca sobre la calidad de vida de las mujeres sobrevivientes de CM, minimizando incluso los efectos positivos de la cirugía reconstructiva de la mama (140)(141).

No debemos olvidar tampoco la linfangitis, la complicación más frecuente en pacientes con linfedema, con una incidencia de hasta un 40%. Esta complicación requiere un diagnóstico rápido para iniciar tratamiento con antibióticos, pues en algunas ocasiones precisa de ingreso hospitalario para su correcto tratamiento (142).

El síndrome de red axilar es un efecto secundario muy poco reconocido. Se trata de un proceso autolimitado que afecta hasta a un 6% de pacientes con cirugía axilar y generalmente desaparece en 1 a 6 meses. Se caracteriza por dolor, limitación del hombro en flexión y abducción y, sobre todo, presenta la aparición de un cordón visible y/o palpable en la axila o en la cara interna del miembro superior ipsilateral que puede llegar hasta la muñeca y puede confundirse con una linfangitis (143)(144).

Cualquier tipo de cirugía de la axila puede provocar limitación funcional de la articulación gleno- humeral con una disminución inmediata, pero temporal, de la abducción del hombro debido al dolor postoperatorio y al miedo a la movilización. Se ha demostrado que una movilización precoz mejora esta limitación. Si la disminución de la abducción persiste, una vez pasado el postoperatorio precoz, podría estar relacionada con otros problemas que restringen mecánicamente el movimiento o inducen dolor de forma secundaria (145).

La disfunción neuromotora es muy rara. Sin embargo, la disfunción neurosensorial, referida como parestesias y acorchamiento/entumecimiento de la

extremidad ipsilateral, es una de las complicaciones más frecuente encontrada en varios estudios, con una incidencia de más del 50%. Los nervios sensoriales que atraviesan la almohadilla adiposa axilar frecuentemente se lesionan durante la resección de los ganglios axilares. Incluso en los casos en los que es posible conservar estos nervios, la eliminación del tejido de soporte circundante puede conducir a la disfunción del nervio sensorial. El nervio intercostobraquial es el principal responsable de este síntoma. Estos efectos tienen su máxima incidencia a los 6 meses, van disminuyendo con el tiempo y en la mayor parte de los casos no limita la calidad de vida (5).

La plexopatía braquial tiene una incidencia del 0,4% y clínicamente se define por parestesias y debilidad del miembro superior. Su aparición está relacionada con la irradiación a nivel supraclavicular. Si aparecen síntomas, rara vez se resuelven por completo y el riesgo de desarrollar esta toxicidad no disminuye con el tiempo (130).

Teniendo en cuenta la elevada incidencia del CM y su prevalencia, todos estos efectos secundarios afectan a muchas mujeres, por lo que es muy importante poder seleccionar los casos que precisan tratamiento locorregional axilar.

## **1.8. BIOPSIA SELECTIVA DE GANGLIO CENTINELA**

### **1.8.1. Antecedentes históricos**

El concepto de GC fue definido por primera vez por Gould y cols.(1960) en tumores de parótida, como un ganglio situado de manera constante en la confluencia de las venas facial anterior y posterior y cuyo análisis, durante la cirugía del cáncer, determinaba si debía realizarse o no una disección ganglionar radical del cuello (146). Pero fue el urólogo Ramon Cabanas en 1977, quien realizó una verdadera formulación de la hipótesis del GC en su estudio de cáncer de pene. Mediante contraste radiológico y guiándose por linfografía, fue capaz de localizar este ganglio describiéndolo como el lugar al que primero llegaban las metástasis ganglionares y, si su biopsia era negativa, se podía evitar la resección en bloque del resto de los ganglios de la cadena inguino-fémoro-iliaca (147). Este trabajo tuvo poca difusión, hasta que Morton en 1992 aplicó el concepto de GC en pacientes con melanoma. Realizó un estudio con 223 pacientes, con

exéresis de la lesión y del GC, que identificaba siguiendo los canales linfáticos teñidos de azul tras la inyección del colorante y realizando también una linfadenectomía regional completa. Sus buenos resultados con la técnica hicieron que se comenzara a estudiar el GC en otros tumores sólidos (148).

El primero en utilizar el GC en la mama fue David Krag. En el año 1993 realizó un estudio en 22 pacientes con CM, identificando el GC en 18 casos. Utilizó trazadores isotópicos y una sonda de detección gamma durante la cirugía para la identificación del GC. De esta manera, la Medicina Nuclear entró a formar parte del tratamiento multidisciplinar del CM (149).

En 1994, Giuliano y cols. consiguieron localizar el GC en el CM intraoperatoriamente mediante el uso de colorantes vitales (150).

En 1996, Albertini y cols. publican un trabajo en el combinan ambos métodos de localización, consiguiendo mejores resultados (151).

En 2007, Krag publica un estudio con 5.611 casos de mujeres con CM, consiguiendo la identificación del GC en un 97% de los casos y con una tasa de falsos negativos del 9,8%. A partir de ese momento, la validación del procedimiento de BSGC condujo a un abandono progresivo de la LA en pacientes con CM con axila clínica y ecográficamente negativa al diagnóstico, realizándose únicamente en aquellos casos en los que se detectaban metástasis en el GC o éste no se conseguía identificar (152).

### **1.8.2. Concepto de ganglio centinela**

El GC, al igual que la LA, tiene como objetivo el control regional de la enfermedad y la estadificación de la paciente y, además, conlleva una importante disminución de la morbilidad.

El GC “es el primer ganglio que recibe el flujo linfático aferente directamente de un tumor sólido invasor primario”, flujo que posteriormente progresa hacia ganglios linfáticos secundarios y terciarios. Esta “progresión ordenada” de las metástasis es el origen de la idea del GC. La localización y biopsia de este primer ganglio, en pacientes

diagnosticadas de CM, con axila clínica y ecográficamente negativa, predice el estado histológico del resto de los ganglios axilares. De esta manera se puede prescindir de la disección de los ganglios linfáticos axilares en los casos en que dicho ganglio sea negativo, disminuyendo la morbilidad causada por la LA (el riesgo de linfedema después del GC es del 5% y de un 16% tras la disección axilar).

## **ANATOMÍA LINFÁTICA DE LA MAMA Y LA AXILA**

El flujo linfático es unidireccional y se lleva a cabo por vasos cutáneos y parenquimatosos.

En la mama podemos distinguir dos redes linfáticas, un plexo de situación superficial y un plexo subdérmico profundo, íntimamente anastomosados entre sí mediante vasos linfáticos. Los estudios "halstedianos" hicieron pensar que la afectación ganglionar se llevaba a cabo de una manera escalonada y progresiva desde los grupos periféricos a los centrales. Los trabajos de finales del siglo XX lo confirmaron comprobando que sólo un 2% de las metástasis rompía esta secuencia.

Las técnicas de linfoescintigrafía confirman que la dirección preferente del drenaje linfático de todos los cuadrantes de la mama es hacia los ganglios linfáticos axilares homolaterales y que existen rutas de drenaje alternativas, siendo la más importante la de la mamaria interna. Otras vías son la transpectoral que alcanza los ganglios de Rotter, la retropectoral que es el mecanismo más directo de llegar a los ganglios subclaviculares y una vía abdominal, infrecuente, que llegaría a los ganglios supradiafragmáticos.

## **INDICACIÓN CLÍNICA**

Los criterios de inclusión y exclusión para la realización de la BSGC consensuados por la Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria (153) se resumen en la siguiente tabla (Tabla 5). Las indicaciones y contraindicaciones son las mismas para los varones y las mujeres.

Tabla 5: Criterios de inclusión y exclusión para la realización de la BSGC.

<b>CRITERIOS DE INCLUSIÓN</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- CM infiltrantes T1-2-3 con axila negativa</li> <li>- CM intraductal con indicación de mastectomía</li> <li>- CM intraductal con alto riesgo de microinfiltración</li> </ul>
<b>CRITERIOS DE EXCLUSIÓN</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- CM infiltrante con ganglios metastásicos al diagnóstico (verificado con pruebas de imagen y al menos PAAF)</li> <li>- CM inflamatorio</li> <li>- Radioterapia axilar previa a dosis de 50 Gy</li> <li>- CM localmente avanzado con infiltración ganglionar en ausencia de tratamiento sistémico</li> </ul>

Según el consenso actual no existe contraindicación para la BSGC en:

- Biopsia escisional previa (siempre que no aparezcan criterios de exclusión).
- Cirugía Plástica de aumento o reducción mamaria previa.
- Tumores multifocales o multicéntricos.
- Cirugía conservadora con BSGC previa por CM (necesaria una valoración individualizada).
- Mujeres gestantes o púerperas lactantes (previa retirada de la lactancia 24 horas antes). Se recomienda utilizar la mínima dosis posible de trazador y realizar la inyección el mismo día de la cirugía. En estos casos está contraindicado el uso de cualquier colorante vital.
- Radioterapia previa a nivel axilar y /o mamario.
- CM T4b (en casos seleccionados con infiltración focal de la piel).

Respecto a la realización de la BSGC en pacientes tras neoadyuvancia, las indicaciones han cambiado a medida que se ha ido adquiriendo experiencia. En el año 2013 se publicaron los resultados del estudio SENTINA y el ACOSOG Z1071 (154) (155)(156) . En ambos ensayos se consideró que una tasa de falsos negativos superior al 10% no eran aceptables y no se recomendaba su realización. En ensayos posteriores se incluyeron modificaciones técnicas como el marcaje de los ganglios linfáticos axilares patológicos en el momento del diagnóstico con clip o semilla de <sup>125</sup>I, la utilización de un trazador dual y la recuperación de al menos 3 GC. Esto permitió la localización del GC y reducir la tasa de falsos negativos tras la neoadyuvancia (157).

### 1.8.3. Técnicas de detección del ganglio centinela

#### MARCADORES

Los marcadores utilizados para la localización del GC son variados y podemos distinguir:

#### COLORANTES

Existen 3 tipos de colorantes que se pueden utilizar: azul de isosulfan, azul patente y azul de metileno. La tasa de identificación descrita con su uso alcanza el 95%. Aunque no es la técnica recomendada como técnica única para la mayor parte de las sociedades científicas, su fácil acceso hace que se tenga en cuenta su uso en países emergentes (158).

El uso de colorantes tiene como inconvenientes la necesidad de una incisión axilar mayor para poder visualizar los linfáticos y ganglios teñidos, no se puede disponer de linfogammagrafía previa, existe la posibilidad de necrosis cutánea y de reacciones anafilácticas en un 0,56- 1% de los casos (159)(160).

#### RADIOTRAZADORES

Son pequeñas sustancias coloidales o micelas que se marcan con  $^{99m}\text{Tc}$ . El radiotrazador ideal debe tener un rápido tránsito hacia el GC y una retención prolongada en el mismo. Los coloides que mejor visualizan los canales linfáticos son los que tienen un tamaño de partícula entre 5-50 nm, lo suficientemente pequeño para facilitar la rápida migración hacia los capilares linfáticos y lo suficientemente grande para no pasar al torrente sanguíneo. En Europa se utilizan  $^{99m}\text{Tc}$ -albúmina nanocoloide (50-100 nm) y el  $^{99m}\text{Tc}$ -sulfuro de renio coloidal (100 nm). Ya en el ganglio son fagocitados por los macrófagos donde permanecen hasta ser destruidos. Esto permite la visualización del GC en la gammagrafía y su posterior localización en el quirófano con la sonda gamma-detectora. La dosis varía entre 18,5-111 MBq (0,5-3 mCi), en función del tiempo transcurrido desde la inyección hasta la intervención (161).

Se están desarrollando nuevos radiotrazadores compuestos por una estructura de dextrano (162).

La mayor parte de las sociedades científicas consideran ésta como la técnica de elección, ya que ha demostrado tener la mayor tasa de detección del GC. Sin embargo, se recomienda utilizar una técnica mixta, con radiotrazador y colorante, durante el periodo de aprendizaje o validación, cuando en la linfogammagrafía hay dificultad para visualizar el GC y tras la neoadyuvancia (163)(157).

### **TRAZADORES FLUORESCENTES**

En la actualidad, el verde de indocianina (IGC) es un marcador visible (fluorescencia) que se está utilizando para la detección del GC. La detección es similar a los radiotrazadores, con una tasa de falsos negativos del 8%. Es una técnica más económica que los radiotrazadores y, por tanto, a tener en cuenta en centros hospitalarios donde no se disponga de Medicina Nuclear y en países en desarrollo. Uno de los principales inconvenientes es la atenuación de la fluorescencia en tejidos, lo que dificulta su detección en profundidades superiores a 1 cm y tampoco se puede disponer de una imagen previa de los ganglios (164)(165).

### **PARTÍCULAS DE ÓXIDO DE HIERRO SUPERPARAMAGNÉTICO**

Las partículas de óxido de hierro superparamagnético (SPIO) tienen un diámetro de 60 nm, similar a la mayoría de los radiotrazadores. El primer estudio multicéntrico que se realizó utilizando esta partícula para la detección del GC, no demostró diferencias significativas en la tasa de detección respecto a otros radiotrazadores. Estas partículas pueden persistir en el lugar de la inyección hasta en un 20% de los casos y esto produce artefactos en los estudios de RM que se suelen realizar en el seguimiento de estas pacientes. Tampoco podemos disponer de un mapeo previo a la cirugía (166) (167). En estudios recientes se une el uso del radiotrazador con la realización de una RM, exenta de radiación, para valorar la migración preoperatoriamente (168).

## DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

Los radiotrazadores anteriormente descritos se inyectan en la vecindad de la lesión o periareolarmente de forma superficial o profunda. En las inyecciones profundas se objetiva drenaje a ganglios linfáticos no axilares en un 20- 40%, lo que demuestra unas vías de drenaje separadas para el drenaje profundo y el superficial.

En líneas generales, la inyección del marcador se realiza de la siguiente manera:

- Peritumoral en lesiones claramente palpables.
- Intratumoral/ Peritumoral (con localización radiológica) en lesiones no palpables en las que se vaya a realizar tumorectomía guiada con arpón.
- Periareolar en lesiones no palpables, tumores multifocales o multicéntricos, biopsia escisional previa, lesiones palpables y no palpables de localización alta en las que el GC pudiera quedar oculto por la proximidad de la actividad inyectada en el tumor, pacientes en las que existe riesgo de no visualizar el GC (macromastia, IMC elevado, mayores de 70 años).

Con los radiotrazadores podemos realizar una linfogammagrafía para objetivar la migración del radiotrazador y tener información sobre el número y la localización del GC. Las imágenes se obtienen de forma secuencial, en diversas proyecciones y a distintos intervalos de tiempo, desde los 15-30 minutos de la inyección hasta las 2-4 horas o hasta la identificación del GC. Si se dispone de equipos de SPECT-CT se aconseja utilizarlo si no se consigue identificar el GC en la linfogammagrafía o si se precisa una localización anatómica más precisa para la cirugía (casos de ganglios extraaxilares o con aparente contaje radiactivo bajo).

Para la detección intraoperatoria del GC se utiliza una sonda portátil detectora de partículas gamma. Existen múltiples modelos de sondas, pero siempre se recomienda que sea ergonómica, manejable y con un sistema que ofrezca simultáneamente la cifra de cuentas obtenida y una señal audible concordante. Durante el acto quirúrgico, se considera GC el que tenga una actividad máxima en la región donde se ha localizado previamente en la linfogammagrafía y todos los que tengan una actividad superior al



10% de la cifra máxima obtenida con el GC. Independientemente del contaje, se debe explorar la axila y extirpar cualquier ganglio sospechoso, ya que ganglios con gran afectación metastásica podrían no dejar llegar el radiotrazador y de esta forma disminuimos el número de falsos negativos (169).

Aún hoy en día, es controvertido realizar o no la BSGC si existe migración hacia la cadena mamaria interna independientemente del estado de los ganglios axilares. Si no existe migración hacia la axila y sólo migra hacia la mamaria interna se recomienda su exéresis, siempre que técnicamente sea factible (170).

#### **1.8.4. Estudio anatomopatológico del ganglio centinela**

El análisis del GC es muy importante pues, en el caso de su afectación, conlleva una actuación terapéutica que es la realización de LA. Por ello se prefiere que su estudio sea de forma intraoperatoria, incluso aunque se sigan los criterios de ACOSOG-Z0011 (171).

Tan importante como la realización del GC es la protocolización de su estudio anatomopatológico. Ya se realice este estudio como intraoperatoria o de forma diferida, existen varios métodos, pero deben proporcionar la máxima sensibilidad y especificidad diagnóstica (172).

#### **ESTUDIO HISTOLÓGICO CONVENCIONAL (ULTRAESTADIFICACIÓN)**

Este estudio se realiza en el ganglio fijado con formaldehído. Se realizan secciones del ganglio de unos 2 mm de espesor, perpendiculares a su eje mayor y cada sección se incluye en parafina según el método convencional. Se obtienen secciones de cada bloque de parafina a distintos niveles (en general cada 200  $\mu\text{m}$ ), realizándose tinción con HE y estudio inmunohistoquímico con CK si se considera necesario, para poder detectar las metástasis en el ganglio. Es un método indicado para estudio diferido (173).

## **TÉCNICA DE CONGELACIÓN**

Se utiliza en la evaluación intraoperatoria. Se realizan secciones del GC de 2mm de grosor, perpendiculares a su eje mayor y se realizan cortes por congelación en todas ellas. El proceso de cortar una sección congelada puede producir una pérdida de tejido y las secciones congeladas, en general, muestran una histología más distorsionada en comparación con las secciones de tejido incluidas en parafina. Aunque permite detectar macrometástasis (>2 mm), la sensibilidad de la prueba está entre 57-74%, siendo menor para la micrometástasis y en los casos de CM tipo lobulillar (172).

## **EXTENSIÓN CITOLÓGICA (IMPRONTAS O RASPADO)**

Se utiliza para el estudio intraoperatorio del GC como alternativa a las secciones por congelación. Se realizan secciones del GC de 2 mm de grosor, perpendiculares a su eje mayor y se realiza una extensión citológica de cada superficie de sección que se tiñe con HE. Esta técnica no presenta los inconvenientes de la congelación, pero dado que necesita de la interpretación de un patólogo experimentado y la sensibilidad varía entre un 33 y un 73%, es un método poco recomendado (172).

## **TÉCNICAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA**

Se utilizan anticuerpos frente a CK (AE1/AE3, 7, 19) y se realizan de forma diferida sólo en casos dudosos, incrementando en un 15- 20% la detección de micrometástasis. Es recomendable realizar el estudio inmunohistoquímico en caso carcinoma lobulillar, por la discohesividad, monomorfismo y grado nuclear bajo que suele presentar este tipo de tumor en la mayoría de los casos (174).

## **ESTUDIO MOLECULAR**

La detección de metástasis en el GC con técnica molecular es una alternativa a su estudio con las técnicas histológicas previamente descritas. El primer estudio de intraoperatorio del GC en CM con esta técnica fue realizado por Tsujimoto (2007) y, posteriormente, se ha ido extendiendo su aplicación a otros tumores sólidos, tanto de manera intraoperatoria como diferida (175).

El método OSNA es una técnica que permite el análisis intraoperatorio del GC en los casos de pacientes con CM. La novedad de este método es que permite analizar la totalidad del ganglio durante el procedimiento quirúrgico, evitando que la paciente deba volver a someterse a una nueva cirugía para realizar la LA si el análisis postoperatorio resultase metastásico. Además, es un método rápido, automatizado, reproducible y con alta sensibilidad (95,3%) y especificidad (94,7% ) diagnóstica en comparación con las técnicas de histológicas (176).

Esta técnica se basa en la detección de copias de ARNm de CK19, proteína del citoesqueleto que se expresa en células epiteliales, permitiendo discriminar entre un ganglio con o sin afectación metastásica.

Con este método se obtiene una información cuantitativa sobre la Carga Tumoral Total (CTT) del GC, que es el número de copias de ARNm de CK19, utilizando como técnica de amplificación la denominada RT-LAMP (*Loop Mediated Isothermal Amplification*).

La correlación entre el número de copias de ARNm de CK19 (CTT) y el tamaño de las metástasis fue establecida de la siguiente manera (7):

- Macrometástasis si igual o superior a 5.000 copias.
- Micrometástasis si entre 250- 5.000 copias.
- Negativo si inferior a 250 copias.

La CTT del GC por el método OSNA es una variable de gran valor para establecer "puntos de corte" que permitan predecir la afectación de GNC y , por tanto, para la toma de decisiones terapéuticas durante el acto quirúrgico (177)(178).

El estudio de Peg y cols.(2013) demuestra que la CTT es un factor predictivo independiente de metástasis en GNC, recomendando como "punto de corte" 15.000 copias para no realizar LA (179).

Para la realización de esta técnica es necesario que el CM exprese CK19 en al menos un 30% de las células tumorales (en BAG diagnóstica), que el GC tenga un peso  $\geq 0,05$  gramos y que la manipulación de éste sea cuidadosa para evitar falsos positivos por “contaminación” con celularidad epitelial. La posibilidad de la presencia de inclusiones epiteliales benignas en GC axilares, que determinarían un resultado falso positivo, hay que tenerla en cuenta, pero es muy infrecuente (180).

### 1.9. INFILTRADO INFLAMATORIO TUMORAL

Es bien conocido el papel fundamental del sistema inmune en la hemostasis tisular mediante la inmunovigilancia continua, con la activación e inactivación de la respuesta inflamatoria.

La transformación neoplásica altera la estructura ordenada de los tejidos induciendo una respuesta inmune que podría eliminar tumores incipientes. El sistema inmune no tiene capacidad para rechazar un tumor clínicamente detectable y nunca se había considerado importante la inmunogenicidad de los tumores sólidos hasta hace relativamente poco tiempo. En los últimos años, se ha demostrado que la inmunogenicidad del tumor es importante en la biología tumoral e incluso en la respuesta al tratamiento y, por ello, la valoración del infiltrado inflamatorio tumoral ha tenido un creciente interés, hasta considerarse como un nuevo biomarcador pronóstico y predictivo.

Los TILs son las células inmunitarias que se observan en muchos tumores sólidos y que se pueden evaluar fácilmente con microscopía óptica en secciones tisulares teñidas con HE, lo cual hace que sea un biomarcador histológico cuantificable y accesible. Las células que constituyen este infiltrado inflamatorio son una mezcla de linfocitos T citotóxicos y T-helper, así como linfocitos B, macrófagos, células “Natural Killer” y células dendríticas.

En el caso del CM, se ha identificado un mayor infiltrado linfocitario en tumores TN y HER2 positivos, e incluso se ha descrito la asociación de los TILs con un mejor pronóstico en etapas tempranas y mejor respuesta al tratamiento neoadyuvante, con lo que su valoración en la práctica clínica diaria es cada vez más importante (8).

Los TILs son células mononucleadas que infiltran el tumor (intratumorales) y su estroma (estromales), reflejo de la respuesta inmune frente a las células tumorales.

La metodología original para cuantificar los TILs en el CM fue descrita por Denkert y cols. en 2010 (181). En la mayoría de los estudios publicados posteriormente se utilizaron sus directrices, pero la variabilidad a la hora de analizar dichos infiltrados y la creciente relevancia de los TILs como un biomarcador, hicieron necesario establecer unos criterios de cuantificación homogéneos, fiables y reproducibles. En el año 2014, un grupo internacional de investigadores y clínicos expertos en CM, publicaron un documento de consenso que es el que se utiliza como guía tanto en la investigación como en la práctica clínica (78).

La evaluación de los TILs se realiza en secciones de tejido incluido en parafina y teñidas con HE, definiendo previamente el área de tejido a evaluar. El estudio en cortes por congelación sólo se admite en el campo de la investigación.

La determinación sistemática de los TILs en el CM está apoyada en la actualidad por estudios que demuestran su valor pronóstico y predictivo. Se ha demostrado una relación entre el aumento de TILs y la mejora de la supervivencia libre de enfermedad en el CM TN y HER2 positivo (182)(76)(183).

Diversos estudios han asociado la presencia de TILs a una tasa de respuesta patológica completa más alta tras terapia neoadyuvante, tanto en tumores TN, HER2 positivos, como en tumores con receptores hormonales positivos (181) (184) (185).

También se ha demostrado que la presencia de linfocitos intratumorales en enfermedad residual tras neoadyuvancia se asocia con un pronóstico más favorable (186) (187) y que los CM metastásicos tienen menos TILs que los tumores primarios (188) (189). Loi y cols. (2014) han demostrado que el valor de TILs junto con el estado ganglionar, el tamaño de tumor y la edad, puede predecir a 5 años la probabilidad de metástasis a distancia.

Todo lo anteriormente descrito es razón suficiente para que la valoración de TILs sea considerada como un biomarcador en el CM y se empiece a realizar de forma sistemática en la práctica clínica.

### 1.10. ¿ES POSIBLE EVITAR LA LINFADENECTOMÍA AXILAR SI UN GANGLIO CENTINELA ES METASTÁSICO?

En la actualidad, gracias a las campañas de cribado y a la sensibilización de las mujeres ante síntomas mamarios de alarma, se consiguen realizar diagnósticos de CM en estadios precoces, tratándose de tumores de pequeño tamaño y sin afectación clínica ni radiológica axilar. La cirugía oncológica de la mama es más conservadora y, desde principio del siglo XXI, también la axilar gracias a la BSGC. La BSGC es la técnica "gold estándar" para la estadificación ganglionar en el CM con axila clínica y radiológicamente negativa. Los casos de GC negativo tienen una supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global similar a las LA que se realizaban sin identificarse afectación axilar durante todo el siglo XX, pero con una morbilidad muy inferior (190) (152).

En el CM precoz, hasta en un 30% de los casos se demuestra afectación del GC cuando se realiza la BSGC. Y una vez realizada la LA, en casi un 50% de los casos, el GC es el único ganglio afectado (6).

Por ello, es importante identificar en qué casos se podría evitar el tratamiento axilar, tanto quirúrgico como radioterápico, cuando el GC es positivo. En el estudio AMAROS se demuestra que la radioterapia axilar obtiene resultados similares a la LA respecto a la recurrencia axilar cuando el GC es positivo. Sin embargo, se continúa realizando el mismo tratamiento axilar cuando el GC está afectado, a pesar de la comorbilidad asociada a dicho tratamiento (191).

En los últimos años, han ido surgiendo numerosos estudios en relación con la búsqueda de marcadores predictivos de afectación de los GNC. En el año 2003, se publicó un metaanálisis que recogía los resultados de 15 estudios de los que se seleccionaron 11. Este análisis concluyó que el tamaño de la metástasis del GC (> 2 mm), el tamaño del tumor primario (> 2 cm), la ILV, la extensión extraganglionar y el número de GC positivos (>1) son factores predictivos de afectación de GNC (192).

Posteriormente, se han publicado diversos nomogramas para valorar distintos factores pronósticos que puedan ayudar a decidir si, ante un GC positivo, hay que

realizar o no la LA. Entre los más conocidos están los del *Memorial Sloan Kettering Cancer Center* de Nueva York (MSKCC), el de Standford, el de Cambridge y el de Tenon, pero tienen la limitación de no considerar los subtipos tumorales como variable independiente. Los nomogramas pueden contribuir como un elemento más para ayudar en la toma de decisiones, pero no único y se debe individualizar cada caso.

Las distintas sociedades científicas como la Sociedad Europea de Oncología Médica (ESMO), la Sociedad Americana de Oncología (ASCO), la Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria (SESPM) y el *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN), dan recomendaciones sobre los casos en los que se podría evitar la LA con niveles de evidencia altos, pero no existe un consenso claro.

En la actualidad hay varios ensayos clínicos que tratan de conocer en qué pacientes con GC positivo se podría evitar el tratamiento locorregional sobre la axila, tanto quirúrgico como radioterápico. Uno de ellos es el estudio POSNOC (*Positive Sentinel Node*), cuya fase de reclutamiento ya ha finalizado, pero con un seguimiento que no se cerrará hasta el año 2026. Son dos grupos de pacientes T1-2 con 1 o 2 GC positivos y con cualquier tipo de cirugía realizada a nivel de la mama; un grupo recibe tratamiento sistémico adyuvante único y otro grupo tratamiento sistémico y tratamiento local sobre la axila (cirugía o radioterapia) (193).

El ensayo SENOMAC (2015) es un estudio prospectivo y multicéntrico, con pacientes con macrometástasis (máximo de 2 GC). En un grupo se realiza LA y en otro grupo no se realiza ningún tipo de cirugía axilar. Está diseñado para valorar la supervivencia específica del CM a los 5 años.

El estudio OPTIMAL (2015) tiene como objetivo demostrar la no inferioridad de la irradiación incidental de la axila en comparación con la irradiación intencional en términos de tiempo libre de enfermedad a 5 años, en pacientes sometidas a cirugía conservadora y con carga tumoral del GC por OSNA entre 250- 15.000 copias de ARNm de CK19.

En resumen, por el momento no hay un consenso claro sobre qué actitud terapéutica axilar es la mejor en las pacientes con macrometástasis en el GC.

# 2

## Justificación de la Tesis

---



## 2. JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS

---

El estado axilar continúa siendo un importante factor pronóstico en el CM. En los casos de CM precoz, con axila clínica y radiológicamente negativa al diagnóstico, la BSGC es la técnica indicada. Del resultado del estudio anatomopatológico del GC depende la realización o no del tratamiento locorregional a nivel de la axila.

Se han implementado múltiples protocolos citológicos e histológicos, algunos poco estandarizables y reproducibles, para el análisis intraoperatorio del GC. Actualmente, el análisis molecular se puede aplicar para el estudio del GC gracias a la técnica OSNA, que permite discriminar de forma concluyente la afectación o no del GC en el tiempo quirúrgico. Es una técnica no patólogo dependiente, fácilmente reproducible y rápida. Está estandarizado que una carga tumoral del GC por método OSNA superior a las 5.000 copias de ARNm de CK19 se relaciona con macrometástasis y, por tanto, es necesario realizar LA.

Se conoce que en las LA que se realizan tras un GC con afectación macrometastásica, hasta en un 40-70% de los casos no existe ningún otro ganglio afectado. Se podría decir que un 50 % de las LA serían evitables.

En la era actual de la medicina de precisión, es necesario personalizar el riesgo de afectación de los GNC y la indicación de la LA de acuerdo con el riesgo de metástasis. Para ello, debemos elaborar un modelo de predicción con datos clínico-patológicos de los que podamos disponer de forma pre e intraoperatoria. Actualmente, en el momento del diagnóstico de CM se obtiene una muestra por biopsia radiológica, que permite el estudio histológico y de factores pronóstico-predictivos inmunohistoquímicos del tumor.

En los últimos años ha ido adquiriendo importancia el estudio del infiltrado inflamatorio tumoral en los tumores sólidos. En el CM se ha estudiado en las piezas de exéresis quirúrgica, pero al demostrarse su valor predictivo en neoadyuvancia en algún

subtipo tumoral, también se está estandarizando su valoración en las biopsias obtenidas con aguja gruesa guiadas por imagen radiológica.

El objetivo principal de esta tesis es analizar si la cuantificación del infiltrado inflamatorio tumoral en la biopsia preoperatoria del tumor y la carga tumoral del GC determinada por OSNA en intraoperatoria, junto con otras variables clínico-radio-patológicas del tumor que se conocen antes de la cirugía, podrían predecir la afectación de los GNC. Esto podría evitar tratamientos innecesarios de la axila, así como la comorbilidad asociada a dicho tratamiento.

# 3

## Hipótesis y Objetivos

---

## 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---

### 3.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO

En la literatura, el estudio del infiltrado linfocitario tumoral (TILs) se ha realizado fundamentalmente en el cáncer de mama triple negativo, considerándose como un factor pronóstico- predictivo. Sin embargo, su análisis en otros fenotipos moleculares de cáncer de mama y su relación con el estado ganglionar es muy limitado. La valoración del infiltrado linfocitario tumoral en el cáncer de mama es fácil de realizar como una técnica de rutina a nivel asistencial, ya que se dispone de una biopsia percutánea al diagnóstico en prácticamente todos los casos. Su análisis preoperatorio se podría considerar como un marcador de la afectación ganglionar en estadios precoces del cáncer de mama y, así, se podría seleccionar a las pacientes antes de realizar una linfadenectomía axilar.

### 3.2. OBJETIVOS

#### **Objetivo principal**

Determinar el valor predictivo del infiltrado linfocitario tumoral en la biopsia percutánea en relación con el estado ganglionar, aplicando la metodología del Grupo de Trabajo Internacional de TILs en Cáncer de Mama.

#### **Objetivos secundarios**

1º. Estudiar la relación del infiltrado linfocitario tumoral con factores pronóstico-predictivos clásicos.

- 2°. Analizar la relación del infiltrado linfocitario tumoral con la carga tumoral del ganglio centinela cuantificada por la técnica molecular OSNA en intraoperatoria.
- 3°. Comparar el infiltrado linfocitario tumoral de la biopsia percutánea y de la pieza quirúrgica.
- 4°. Valorar el infiltrado linfocitario tumoral en el cáncer de mama precoz según el fenotipo tumoral.
- 5°. Analizar la relación de factores clínico-radiológicos con el infiltrado linfocitario tumoral y el estado ganglionar.

# 4

## Material y Métodos

---

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

---

### 4.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio epidemiológico observacional de casos y controles en el que se incluyeron pacientes diagnosticadas de CM infiltrante precoz (T1-T2), sin afectación axilar clínica (cN0), ni radiológica por ecografía ni patológica (PAAF o BAG) al diagnóstico. Todas las pacientes fueron sometidas a la técnica de BSGC, realizándose el estudio intraoperatorio del GC mediante la técnica molecular OSNA (RD-100i Sysmex).

Para la realización del estudio se obtuvo previamente la autorización del Comité de Ética del Hospital Universitario Central de Asturias (Anexo 8.1.).

### 4.2. POBLACIÓN A ESTUDIO

Para la realización del estudio se revisaron las pacientes diagnosticadas de CM precoz en el Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), incluyendo dos grupos de pacientes desde abril de 2014, fecha en la se implantó el estudio intraoperatorio del GC mediante la técnica OSNA:

- Grupo 1: Pacientes en las que el GC analizado por OSNA mostró una carga superior a 5.000 copias de ARNm de CK19 (GC positivo) en cualquiera de los ganglios aislados y con posterior LA.
- Grupo 2: Pacientes en las que el GC analizado por OSNA mostró una carga inferior a 250 copias de ARNm de CK19 (GC negativo) y no se realizó LA.

En el grupo de GC positivo, fue preciso revisar pacientes hasta julio de 2017 para tener un número suficiente para realizar el estudio, ya que hubo pacientes que tuvieron que ser excluidas pues tenían metástasis axilar en el estudio ecográfico

estandarizado al diagnóstico (con confirmación por PAAF/BAG) y, por tanto, no estaba indicada la realización de BSGC.

En ambos grupos el seguimiento se realizó hasta julio de 2021. En total se incluyeron 43 pacientes en el grupo 1 y 41 pacientes en el grupo 2, cumpliendo en ambos los criterios de inclusión y exclusión que se describen a continuación.

**Criterios de inclusión:**

- Diagnóstico histológico de carcinoma infiltrante de mama bien documentado en la BAG de la lesión identificada radiológicamente.
- Tumores que en la BAG presentaron una expresión inmunohistoquímica de CK19 mayor del 30%.
- Tumores con tamaño en imagen radiológica inferior a 5 cm (cT1- T2).
- Axila clínica, radiológica o patológicamente negativa (cN0).
- Ausencia de enfermedad metastásica.
- Realización de BSGC en fase terapéutica.
- Muestra obtenida en la BAG con suficiente representación de tumor infiltrante para poder realizar el estudio de los TILs.

**Criterios de exclusión:**

- Pacientes con diagnóstico por BAG de carcinoma ductal in situ que, por criterios de grado alto, tamaño o tipo de cirugía (mastectomía) se realizó BSGC y que en la pieza de exéresis quirúrgica no se objetivó carcinoma infiltrante.
- Pacientes sometidas a neoadyuvancia, aunque se hubiera realizado la BSGC previa al inicio del tratamiento neoadyuvante.
- Pacientes que recibieron radioterapia en zona torácica o axilar previamente.
- Pacientes gestantes o en fase de lactancia activa.



- Tumores con tamaño en imagen radiológica superior a 5 cm o con afectación cutánea (T3 – T4).
- Confirmación preoperatoria de afectación ganglionar mediante ecografía y, al menos, PAAF de las adenopatías sospechosas con diagnóstico compatible con metástasis de CM.
- Pacientes con enfermedad metastásica (M1) al diagnóstico.
- Tumores sin inmunexpresión de CK19 o que mostraron una expresión de CK19 inferior a un 30 % en la BAG diagnóstica.
- Pacientes con análisis del GC por OSNA entre 250 a 5.000 copias de ARNm CK19.
- Pacientes en las que no se pudo realizar el estudio del GC por OSNA por no cumplir los criterios de peso mínimo del ganglio o superar el número muestras (> 4) para la técnica.
- Casos en los que la conservación de las muestras de la BAG o de la exéresis quirúrgica no permitieron la cuantificación de los TILs.

## **RECOGIDA DE DATOS**

Se revisó la historia clínica de todas las pacientes y se recogieron todos los datos clínicos que se indican posteriormente.

Los datos histopatológicos y los resultados del estudio inmunohistoquímico de los factores pronóstico-predictivos del tumor se obtuvieron del informe anatomopatológico de la BAG realizada al diagnóstico y el tamaño del tumor del informe patológico de la pieza de resección quirúrgica.

Respecto al seguimiento, los datos recogidos fueron la aparición de linfedema, documentado en la historia clínica del seguimiento oncológico o en la historia de rehabilitación, así como la fecha de recaída tumoral o fallecimiento.

De cada paciente se registraron y analizaron los siguientes datos:

**Datos clínicos**

- Edad al diagnóstico.
- Estado hormonal: premenopausia, perimenopausia o postmenopausia.
- Lateralidad: mama izquierda, derecha o bilateral.
- Focalidad: unifocal, multifocal o multicéntrico.
- Antecedentes personales de procesos benignos o malignos de mama.
- Antecedentes personales de neoplasias malignas de otras localizaciones.
- Antecedentes familiares de CM y/o de ovario.
- IMC.
- Datos ginecológicos: menarquia, paridad, lactancia, anticonceptivos hormonales orales, edad de menopausia, tratamiento hormonal sustitutivo.
- Hábitos tóxicos: consumo de alcohol, hábito tabáquico.
- Comorbilidades.
- Tratamiento quirúrgico mamario y axilar.

**Datos radiológicos**

- Tipo de lesión en imagen mamográfica.
- Tamaño de la lesión en imagen mamográfica y en resonancia de mama.

**Datos histopatológicos**

- Tipo histológico.
- GH (Nottingham).
- Presencia de carcinoma intraductal.
- Presencia de ILV y perineural.
- Expresión de TILs.

- Tamaño del tumor (exéresis quirúrgica).
- Inmunohistoquímica (BAG):
  - RE y RP
  - RA
  - Índice de proliferación Ki-67
  - Sobreexpresión/amplificación HER2
  - CK basales 5 y 14
  - Bcl2
  - p53
- Fenotipo molecular.

**Datos axilares**

- Resultado del estudio intraoperatorio del GC:
  - Número total de GC analizados.
  - Número de GC positivos.
  - Número de GC negativos.
  - Número de copias de ARNm de CK19 de cada GC (CTT).
- LA:
  - Número total de GNC.
  - Número de GNC positivos con micrometástasis.
  - Número de GNC positivos con macrometástasis.

**Datos terapéuticos:**

- Tipo de tratamiento quirúrgico.
- Tratamiento adyuvante.

**Datos de seguimiento:**

- Tiempo de seguimiento.

- Periodo libre de enfermedad.
- Progresión y localización de la recaída.
- Presencia de linfedema en la extremidad superior.

### 4.3. OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

En el caso de una lesión sospechosa en el estudio radiológico, se realizó BAG, obteniéndose al menos 4 cilindros. El tejido fue fijado, inmediatamente tras la extracción, en formol tamponado durante 6-8 horas. Las piezas de exéresis quirúrgica se fijaron en formol tamponado 24 horas. En ambos casos, el tejido fue incluido en parafina según el protocolo convencional, realizándose posteriormente secciones histológicas de 5 micras de grosor que fueron teñidas con HE.

En las BAG se realizó el estudio inmunohistoquímico para los factores pronóstico-predictivos (Tabla 6) de manera automatizada (DAKO Autostainer Link 48+), en secciones histológicas de 5 micras de grosor, con un tiempo de incubación con el anticuerpo primario de 20-30 minutos. En los casos necesarios y previamente a la técnica inmunohistoquímica, las secciones histológicas fueron sometidas a un proceso de recuperación antigénica (pTlink a pH6 vs pH9, 60 minutos). Para todos los anticuerpos se utilizaron secciones tisulares adecuadas como controles externos.

**Tabla 6: Inmunohistoquímica en BAG. Anticuerpos primarios.**

ANTICUERPO	CLON
RE	EP1 (Dako)
RP	PgR 1294 (Dako)
RA	AR 441 (Dako)
Bcl-2	124 (Dako)
E-cadherina	NCH-38 (Dako)
CK5/6	D5/16B4 (Dako)
CK 14	LL002 (Novocastra)
CK19	RCK108 (Dako)
p53	DO-7 (Dako)
Ki-67	MIB-1 (Dako)
HercepTest	Policlonal (Dako)

La valoración e interpretación de los RE, RP y HER2 fue realizada siguiendo las recomendaciones de la Sociedad Americana de Oncología (ASCO) / Colegio Americano de Patólogos (CAP) (54) (61). El índice de proliferación Ki-67 se indicó como el porcentaje de células con tinción nuclear. El resto de los anticuerpos se valoró como positivo o negativo en función de su expresión o ausencia de expresión.

#### 4.3.1. Valoración del Infiltrado Linfocitario Tumoral (TILs)

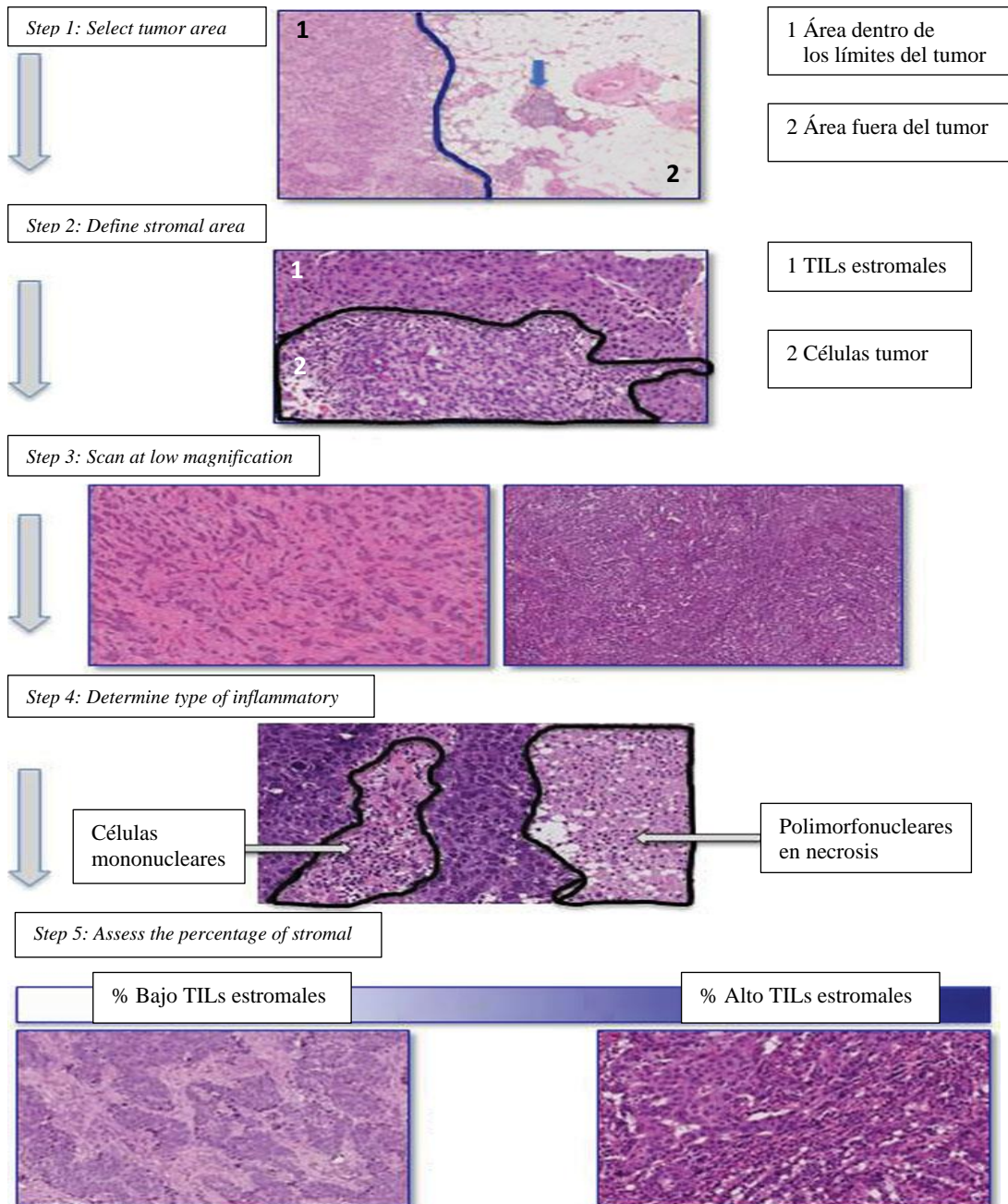
El estudio de los TILs se realizó en todos los casos, tanto en las BAG como en la pieza de resección quirúrgica, en secciones teñidas con HE. Se seleccionaron las secciones histológicas en las que la representación tumoral era suficiente y estaba bien conservada. En la sección de HE seleccionada se valoró la zona tumoral a bajo aumento en el microscopio óptico, para marcar la zona a evaluar.

Para realizar la cuantificación de los TILs seguimos los criterios de consenso del Grupo de Trabajo Internacional liderado por Salgado que se resumen a continuación (78):

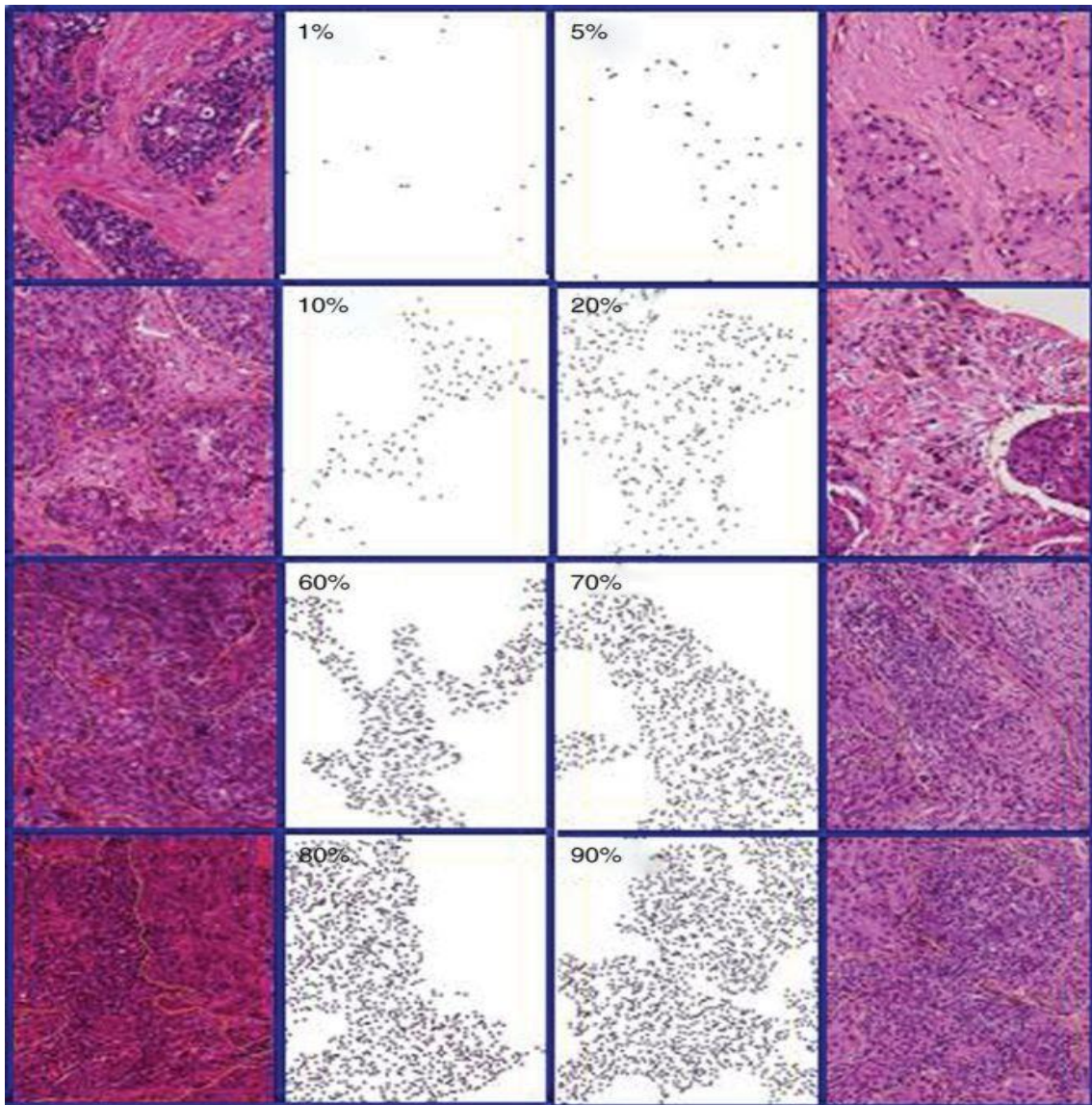
1. Evaluar una sección histológica de 4–5  $\mu\text{m}$ , con objetivo de 20-40x y ocular 10x.
2. Evaluar los TILs dentro de los límites del tumor invasivo, excluyendo los TILs de la zona peritumoral y los que rodean focos de carcinoma in situ y los lóbulos mamarios no tumorales.
3. No incluir en la valoración zonas con artefacto de aplastamiento, necrosis, fibrosis, ni zonas de biopsias previas. También se deben excluir las zonas "calientes".
4. Se valoran los TILs en el compartimento estromal intratumoral como el porcentaje de TILs estromales (área ocupada por células inflamatorias mononucleares en el área estromal intratumoral total). Se incluyen todas las células mononucleares (linfocitos y células plasmáticas) y se excluyen los polimorfonucleares.

Siguiendo estos criterios y las imágenes orientativas del grupo de consenso (Figuras 2 y 3) valoramos los TILs tanto en las BAG como en las muestras de la exéresis quirúrgica de cada paciente.

Basándonos en la bibliografía existente decidimos establecer tres grupos para la cuantificación de los TILs: TILs bajo (0-9 %), TILs intermedio (10-39%) y TILs alto ( $\geq 40\%$ ).



**Figura 2:** Método estándar para la valoración de TILs en el CM (International TILs Working Group. Salgado y cols. 2014).



**Figura 3:** Guía para valorar el porcentaje de TILs estromales en el CM  
(*International TILs Working Group*. Salgado y cols. 2014).

La medida de los TILs es un parámetro semicuantitativo que se expresa en porcentaje. Es el porcentaje del área estromal ocupada por las células inflamatorias mononucleares respecto al área total estromal tumoral.

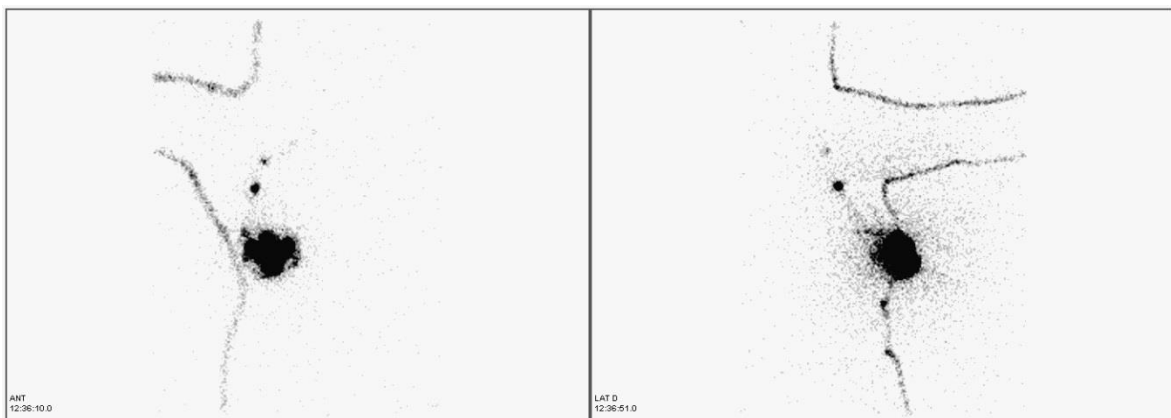
La distribución de los TILs es heterogénea en el tumor y se realiza una media de los TILs en el área estromal del tumor en sección completa.

#### 4.4. TÉCNICA DE MARCAJE DEL GANGLIO CENTINELA E IDENTIFICACIÓN INTRAOPERATORIA

El marcaje del GC se realizó con la inyección del radiotrazador (nanocoloide de albúmina marcado radiactivamente con Tc 99m) entre 2 a 24 horas previamente a la cirugía.

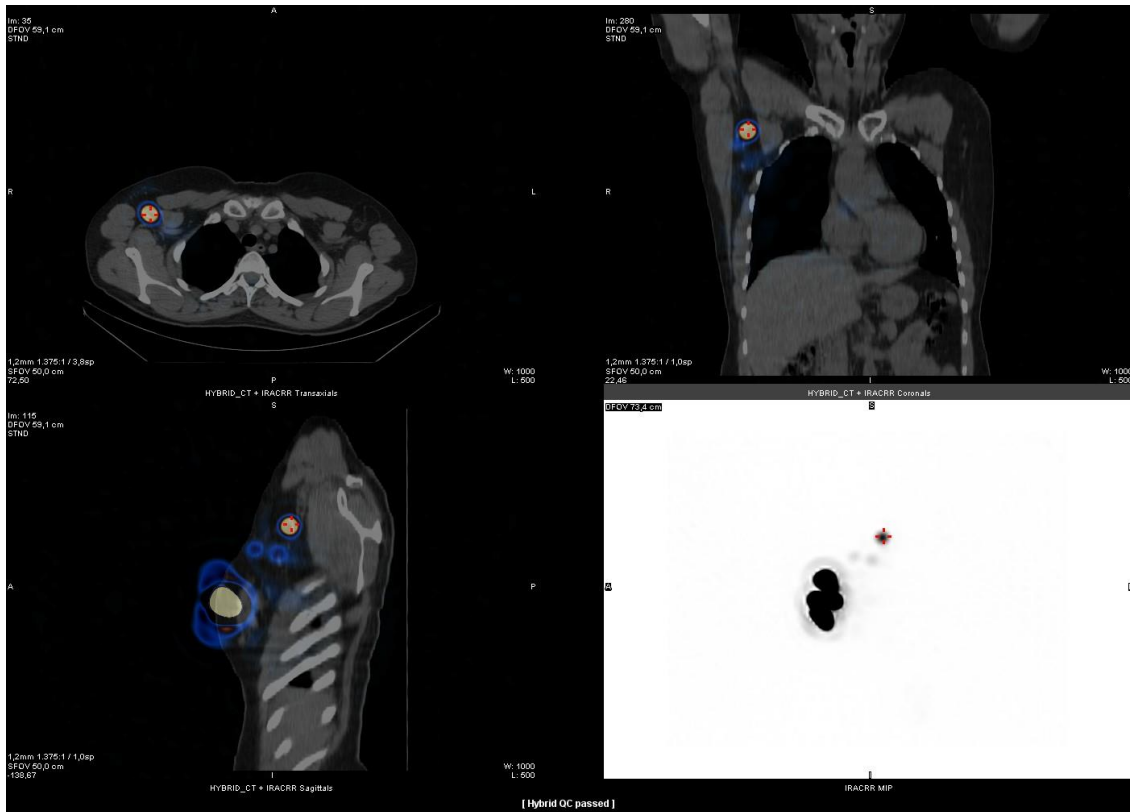
La inyección del radiotrazador fue periareolar y únicamente en algunos casos de tumores palpables se realizó de forma peritumoral. En ambos casos se realizó en los cuatro cuadrantes.

Tras 30 a 120 minutos de la inyección del radiotrazador se obtuvieron imágenes planares en proyección anterior y lateral en la gammacámara (modelo SPECT/CT Discovery NM/CT 670 GE), evaluando la presencia de depósitos en los territorios ganglionares próximos a la lesión primaria. Se realizó siempre una linfogramagrafía con la finalidad de confirmar la migración, identificar el número de GC y evidenciar la posibilidad de drenajes extraaxilares (Figura 4). Las imágenes tomográficas con SPECT-TC fueron realizadas únicamente en los casos en los que no se pudo identificar el GC en la linfogramagrafía o si fue necesaria una localización anatómica más precisa para la intervención quirúrgica, como en el caso de drenaje a la mamaria interna (Figura 5). Con el área preseleccionada gammagráficamente se realizó un marcaje cutáneo de la proyección ganglionar para orientar la localización del GC en el momento de la cirugía.



**Figura 4:** Linfogramagrafía preoperatoria.





**Figura 5:** Imagen tomográfica con SPECT-TC para localización del GC.

En los casos en los que no hubo migración del radiotrazador o existió dificultad en la visualización del GC en la linfogammagrafía preoperatoria, el mismo día de la cirugía se utilizó el colorante vital (azul de metileno), inyectando 2 cc. periareolar con posterior masaje de la mama. Esta técnica se realiza con la paciente anestesiada y monitorizada para control de posibles reacciones anafilácticas.

Para la localización intraoperatoria del GC se coloca a la paciente en decúbito supino con el brazo en abducción a 90°, utilizando una sonda portátil gammadetectora (modelo NeoProbe Neo 2000). El GC en el acto quirúrgico es aquel que presenta una mayor radioactividad detectada por la sonda y que está ubicado en el área preseleccionada gammagráficamente. Se procede a la exéresis de todos los ganglios con una actividad radiactiva, medida con la sonda gammadetectora, superior al 10% de la del ganglio que presenta mayor actividad. Una vez extirpado el o los GC, se comprueba con la sonda gammadetectora que su actividad radiactiva es la detectada “in vivo” (Figura 6). Finalmente, se revisa que en el lecho quirúrgico axilar no hay ninguna zona

que supere el 10% de la radioactividad del GC con mayor actividad y también se realiza una exploración digital de la axila para descartar la existencia de adenopatías sospechosas palpables susceptibles de ser biopsiadas.

En los casos en los que se extirpan juntos más de un GC, se separan para enviarlos individualmente al Servicio de Anatomía Patológica para el análisis intraoperatorio.

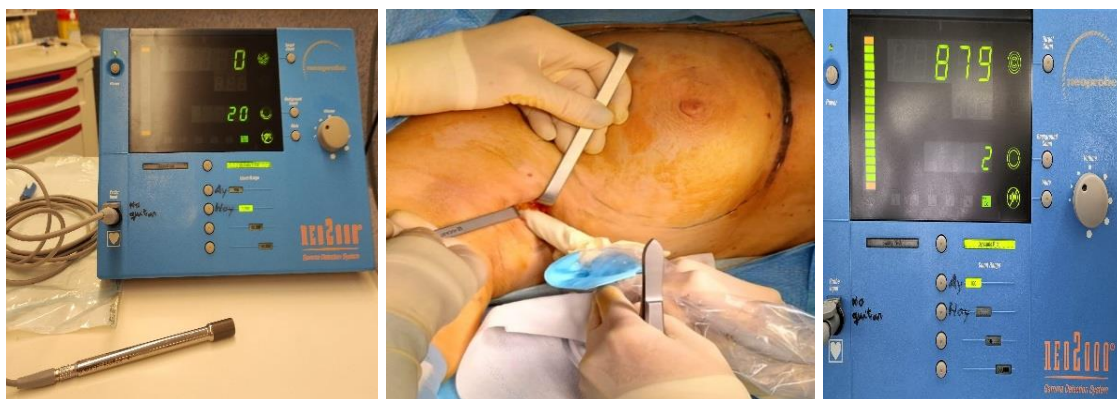


Figura 6: Sonda portátil gammadetectora y localización del GC en el quirófano.

#### 4.5. ESTUDIO INTRAOPERATORIO DEL GANGLIO CENTINELA MEDIANTE MÉTODO MOLECULAR OSNA

Los GC se envían “en fresco” al Servicio de Anatomía Patológica, identificándose el de mayor actividad radioactiva en los casos de haber sido extirpados varios ganglios.

Para el análisis del GC con la técnica OSNA se comprueba, previamente a la intervención, que el tumor presenta inmunexpresión de CK 19 en más del 30% de las células en la BAG diagnóstica y que el peso del ganglio es  $\geq 0,06$  gramos. Si no se cumplen estas dos condiciones, el GC debe analizarse de manera convencional (secciones transversales perpendiculares al eje mayor, de 2 mm de grosor y “raspado” de cada superficie de corte para extensión citológica). Si el ganglio pesa más de 0,60 gramos hay que dividirlo en partes de menor peso, teniendo en cuenta que, si es necesario dividirlo en más de 4 partes, el análisis también es por método convencional.

La técnica OSNA se lleva a cabo en tiempo real, sin necesidad de purificar previamente el ARN y se realiza en una sala del Servicio de Anatomía Patológica dedicada exclusivamente a este fin. Los radiotrazadores utilizados para identificar el GC, incluso los colorantes que en algunas ocasiones se tienen que utilizar, no afectan a la reacción OSNA. El patólogo aísla cada ganglio de forma individual, utilizando material estéril diferente para cada ganglio, disecando el tejido adiposo periganglionar cuidadosamente para evitar seccionar la cortical del ganglio. Este tejido adiposo extranodal se procesa de manera diferida para estudio histológico convencional para descartar afectación extraganglionar. Si el ganglio pesa más de 0,60 gramos, se divide en partes cuyo peso esté entre 0,06 y 0,60 gramos (no más de 4 partes para la técnica de OSNA) (Figura 7). En estos casos, la CTT del ganglio es la suma de las copias de cada una de las partes en las que fue dividido.

Posteriormente, el ganglio se homogeniza con una “licuadora” en 4 ml de tampón de lisis durante 90 segundos (manteniendo el tubo con la muestra frío en hielo) y el homogeneizado se centrifuga a 10.000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente. A continuación, una muestra de 2 $\mu$ L del sobrenadante (“lisado”) se introduce en el equipo donde tiene lugar la reacción (RT-LAMP, amplificación isotérmica a 65° C, 6 primers) y que nos da la información sobre el número de copias de ARNm de CK19 que hay en la muestra, que a su vez se correlaciona con el número de células tumorales (Figura 8). Todo el proceso se lleva a cabo de forma intraoperatoria en un tiempo inferior a los 60 minutos (dependiente del número y tamaño de los ganglios procesados).

El resultado se expresa como el número de copias de ARNm de CK19 y la carga metastásica se interpreta de acuerdo con los límites de corte establecidos por Tsujimoto (7) (Figura 9):

- Macrometástasis: >5.000 copias de ARNm de CK19.
- Micrometástasis:  $\geq 250$  copias, pero  $\leq 5.000$  copias de ARNm de CK19.
- No metástasis: < 250 copias de ARNm de CK19.



Figura 7: Sala y equipo RD-100i Sysmex. Disección y peso del GC.



Figura 8: Homogenizado del GC (sobrenadante). Equipo análisis del GC.

 Figure 9 is a photograph of a computer monitor displaying a software interface for a diagnostic test. The interface shows a table with columns for 'V', 'Fecha', 'Hora', 'ID de muestra', 'ApI.', 'CK19 Q.', 'CK19 SQ.', and 'CK19 C. [cCP/uL]'. The table contains three rows of data, all indicating positive results for CK19.
 

V	Fecha	Hora	ID de muestra	ApI.	CK19 Q.	CK19 SQ.	CK19 C. [cCP/uL]
<input checked="" type="checkbox"/>	V 26/10/21	13:36	21B-22912-1	BC	(Pos.)	(++)	2.0E+04
<input checked="" type="checkbox"/>	V 26/10/21	13:36	21B-22912-2	BC	(Pos.)	(++)	1.0E+06
<input checked="" type="checkbox"/>	V 26/10/21	13:37	21B-22912-3	BC	(Pos.)	(++)	8.2E+05

Figura 9: Ejemplo interpretación de los resultados de las copias ARNm de CK19 (positivo, macrometástasis).

#### 4.6. ESTUDIO DIFERIDO DE LOS GANGLIOS NO CENTINELA

La LA se realiza cuando el GC presenta macrometástasis y el análisis de los ganglios se hace de forma diferida mediante técnica histológica convencional.

La muestra axilar se pesa y mide y todos los ganglios disecados se incluyen completamente para su estudio histológico en secciones de HE. No se utilizaron técnicas de tinción inmunohistoquímica para el análisis de estos ganglios.

Las metástasis se clasifican como (AJCC, 2018):

- Macrometástasis: tamaño de la metástasis  $> 2$  mm.
- Micrometástasis: tamaño de la metástasis entre 0,2 y 2 mm o más de 200 células tumorales en una sección tisular.
- Células tumorales aisladas: tamaño  $< 0,2$  mm o menos de 200 células en una sección tisular.

En nuestro estudio, cualquier tipo de metástasis detectada en los GNC se consideró como resultado positivo.

#### 4.7. ANÁLISIS DE DATOS Y MÉTODO ESTADÍSTICO

El estudio estadístico de todos los datos recogidos se realizó con el programa *IBM SPSS Statistics v25* para *Windows*. En el análisis univariante de variables cualitativas se utilizó el *test de Chi cuadrado* y para las variables cuantitativas realizamos un análisis de regresión lineal. La comparación de las medias de las diferentes variables se hizo con el *test t-Student*.

Se realizó un análisis descriptivo de toda la información obtenida de las diferentes variables incluidas en el estudio. Las variables cualitativas y cuantitativas se agruparon en tablas de frecuencia.

Se analizó la existencia o no de asociación entre los datos clínicos, radiológicos y anatomopatológicos con la afectación del GC y de los GNC (en el caso de LA).

Para el análisis multivariante se establecieron los grupos de GC positivo y GC negativo. Y en el caso de GC positivo (grupo de pacientes con LA), dos subgrupos, con GNC positivos y con GNC negativos.

Así mismo, utilizamos modelos de regresión logística, con el fin de identificar los factores que definitivamente se asocian de forma independiente con la variable dependiente y la magnitud de su efecto ajustado.

Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando se obtuvo una  $p < 0,05$ .

# 5

## Resultados

---



## 5. RESULTADOS

---

### 5.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y PATOLÓGICAS

Se estudió una muestra de 84 pacientes que cumplían los criterios preestablecidos. Todos los casos fueron mujeres. La edad media fue de 58,07 +/- 11,8 años (rango 35-80).

En el momento del diagnóstico 32 pacientes eran premenopáusicas, no se pudo conocer el estado hormonal de 5 de las pacientes y el resto eran postmenopáusicas.

La mayor parte de las mujeres tuvieron descendencia y dieron lactancia materna.

En 37 casos las mujeres referían haber tomado tratamientos hormonales en algún periodo de su vida antes de la menopausia por distintos motivos (anticoncepción, dismenorrea, ovarios poliquísticos, etc).

La mayoría no tenían antecedentes personales de ninguna patología mamaria ni familiares de CM, ni de neoplasias en otras localizaciones.

Hay que resaltar que 48 mujeres presentaban sobrepeso y de éstas 18 obesidad, frente a 32 con un peso adecuado y 4 con bajo peso.

Se registraron comorbilidades en 32 casos, siendo la más frecuente la hipertensión (20 pacientes), las alteraciones tiroideas (6 casos) y la patología cardiológica (6 casos).

Respecto a los hábitos tóxicos, ni el consumo de alcohol ni el tabaco fue frecuente.

Todas las características clínicas de las pacientes se resumen en la siguiente tabla (Tabla 7).

Tabla 7: Características clínicas de las pacientes (n= nº casos).

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	n (%)
<b>Estado hormonal</b>	
Premenopáusica	32 (38,1)
Postmenopáusica	47 (56)
<b>Paridad</b>	
Sí	70 (83)
No	10 (12)
<b>Lactancia</b>	
Sí	48 (69)
No	14 (20)
<b>Toma de ACHO</b>	
Sí	37 (44)
No	38 (45)
<b>Antecedentes de Patología Mamaria</b>	
No	64 (76,2)
Benigna	16 (19)
CM	4 (4,8)
<b>Neoplasias de otras localizaciones</b>	
Sí	5 (6)
No	75 (95,2)
<b>Antecedentes familiares de CM</b>	
Sí	13 (15,5)
No	50 (75)
<b>IMC</b>	
Bajo (<18,5)	4 (4,8)
Normal (18,5-24,9)	32 (38,1)
Sobrepeso (24,9- 29,9)	30 (35,7)
Obesidad (>30)	18 (21,4)
<b>Comorbilidades</b>	
Sí	32 (38)
No	52 (62)
<b>Consumo de alcohol</b>	
Sí	4 (5)
No	80 (95)
<b>Hábito tabáquico</b>	
Sí	15 (28)
No	47 (56)
Exfumadora	22 (26)

En todos los casos se dispuso de muestra obtenida por biopsia percutánea (BAG) en donde se realizó el diagnóstico histológico y los marcadores pronóstico-predictivos inmunohistoquímicos habituales.

Los CM tipo ductal fueron 73 casos (86,9%), frente a 11 tumores lobulillares (13,1%). Respecto al GH, el más frecuente fue el 2 (56%) y sólo el 4,7% casos presentó un GH3. La presencia de carcinoma ductal in situ (CDIS), además del infiltrante, se identificó en 22 casos (26,2%). Tanto la ILV como la invasión perineural fueron muy poco frecuentes (Tabla 8).

**Tabla 8: Características histológicas de los CM (BAG) (n= nº casos).**

ESTUDIO HISTOLÓGICO	n (%)
<b>E-cadherina</b>	
Positiva	73 (86,9)
Negativa	11 (13,1)
<b>Grado Histológico</b>	
1	33 (39,3)
2	47 (56)
3	4 (4,7)
<b>Presencia de CDIS</b>	
Sí	22 (26,2)
No	72 (73,8)
<b>Presencia de Necrosis</b>	
Sí	4 (4,8)
No	80 (95,2)
<b>ILV</b>	
Sí	2 (2,4)
No	82 (97,6)
<b>Invasión perineural</b>	
Sí	1 (1,2)
No	83 (98,8)

El estudio de los marcadores inmunohistoquímicos en la BAG permitió conocer su valor en el momento de la cirugía. En nuestra muestra el 94% de las pacientes expresaban RE y un 91,7% también RA. El índice de proliferación Ki-67 fue bajo en el

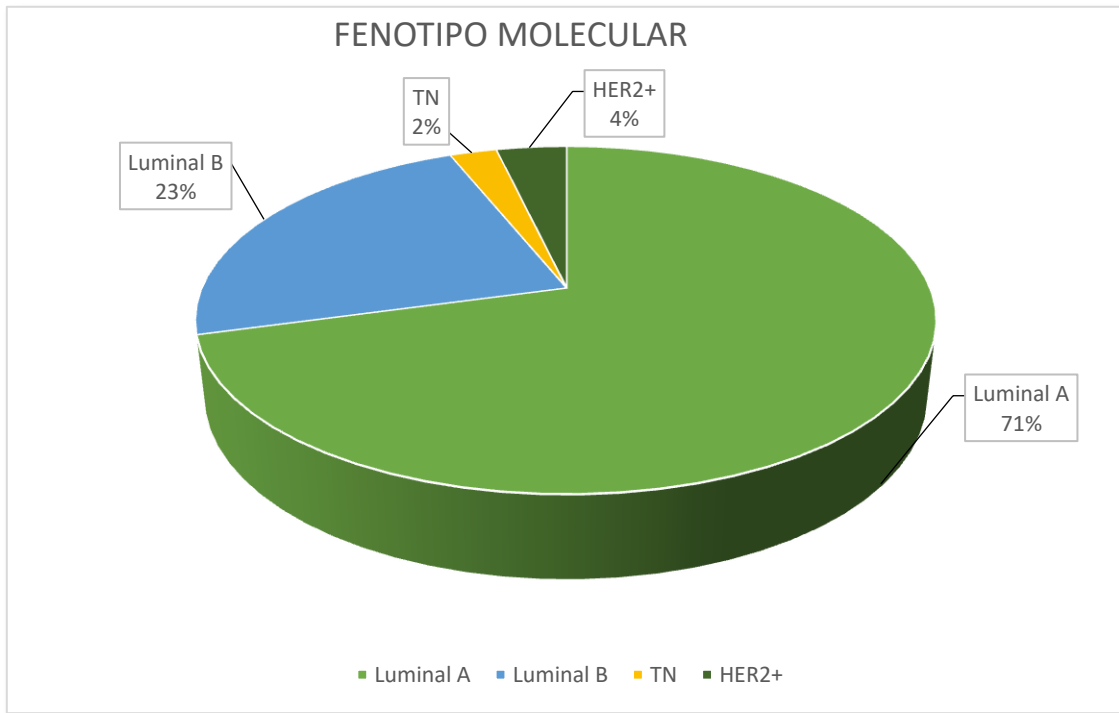
85,7% de los casos, con un valor inferior al 20%. Las citoqueratinas basales (CK 5/6 y CK 14) sólo se expresaron en un 2,4% de los casos estudiados. El 83,3% de los casos no sobreexpresaron HER2.

Todos los marcadores realizados se recogen en la siguiente tabla (Tabla 9).

**Tabla 9: Características inmunohistoquímicas de los CM (BAG) (n= nº casos).**

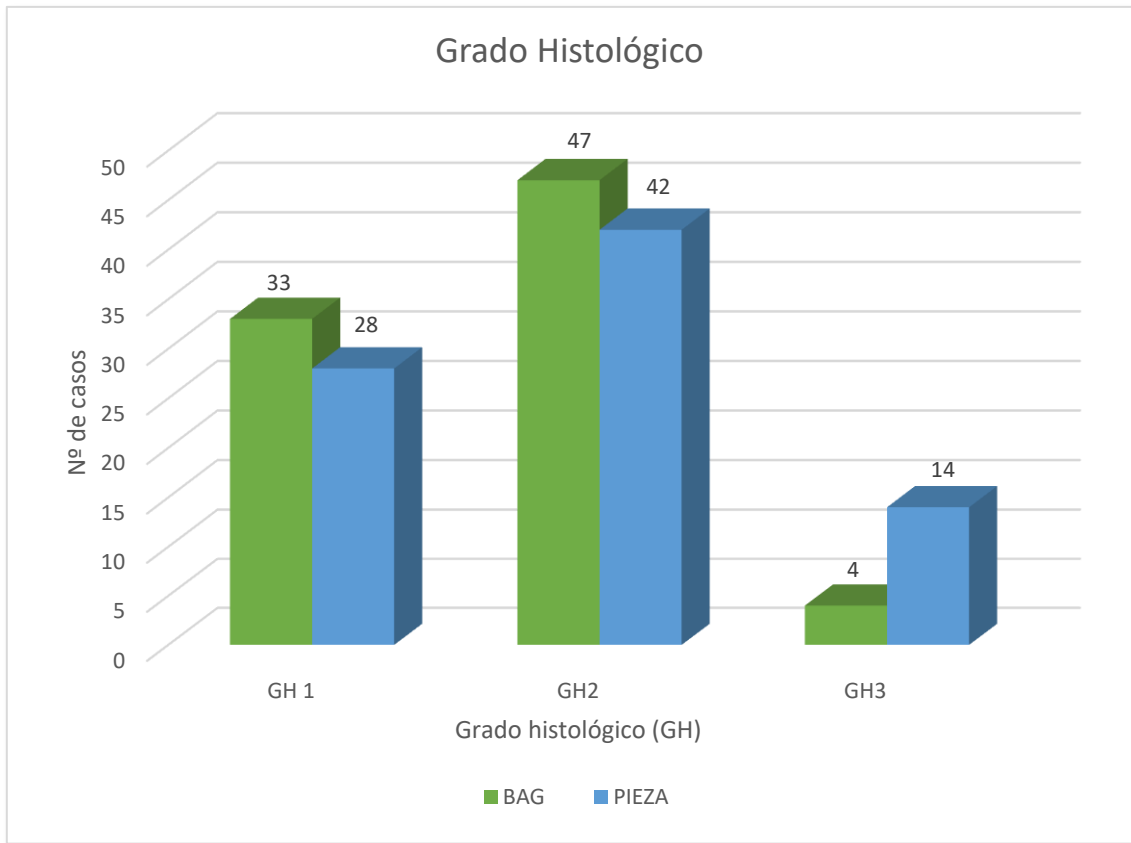
MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS	n (%)
<b>RE</b>	
Positivos	79 (94)
Negativos	5 (6)
<b>RP</b>	
Positivos	70 (83,3)
Negativos	14 (16,7)
<b>RA</b>	
Positivos	77 (91,7)
Negativos	7 (8,3)
<b>Ki -67</b>	
<20	72 (85,7)
≥20	12 (14,3)
<b>P53</b>	
Positivo	22 (26,2)
Negativo	62 (73,8)
<b>Bcl2</b>	
Positivo	79 (94)
Negativo	5 (6)
<b>CK 5/6</b>	
Positiva	2 (2,4)
Negativa	79 (94)
<b>CK 14</b>	
Positiva	2(2,4)
Negativa	82 (97,6)
<b>HER2</b>	
Positivo	12 (14,3)
Negativo	70 (83,3)

Si clasificamos los tumores de nuestra muestra según el patrón molecular, el tipo Luminal A corresponde al 71% de los tumores y el Luminal B representan un 23%, correspondiendo de estos un 7% al Luminal B HER2 positivo. Los tumores TN son un 2% y los HER2 puros un 4% (Figura 10).



**Figura 10:** Distribución CM según fenotipo molecular.

El GH habitualmente se estudia en la pieza de exéresis quirúrgica, pero también es posible valorarlo en la BAG. En todos nuestros casos, contábamos sólo con el GH de la pieza quirúrgica, por lo que analizamos el GH en todas las BAG diagnósticas. El GH 2 fue el más frecuente tanto en las BAG (56%) como en la pieza de exéresis (50%). Sólo un 5% de los CM fueron GH3 en las BAG frente a un 17% en la pieza quirúrgica (Figura 11).

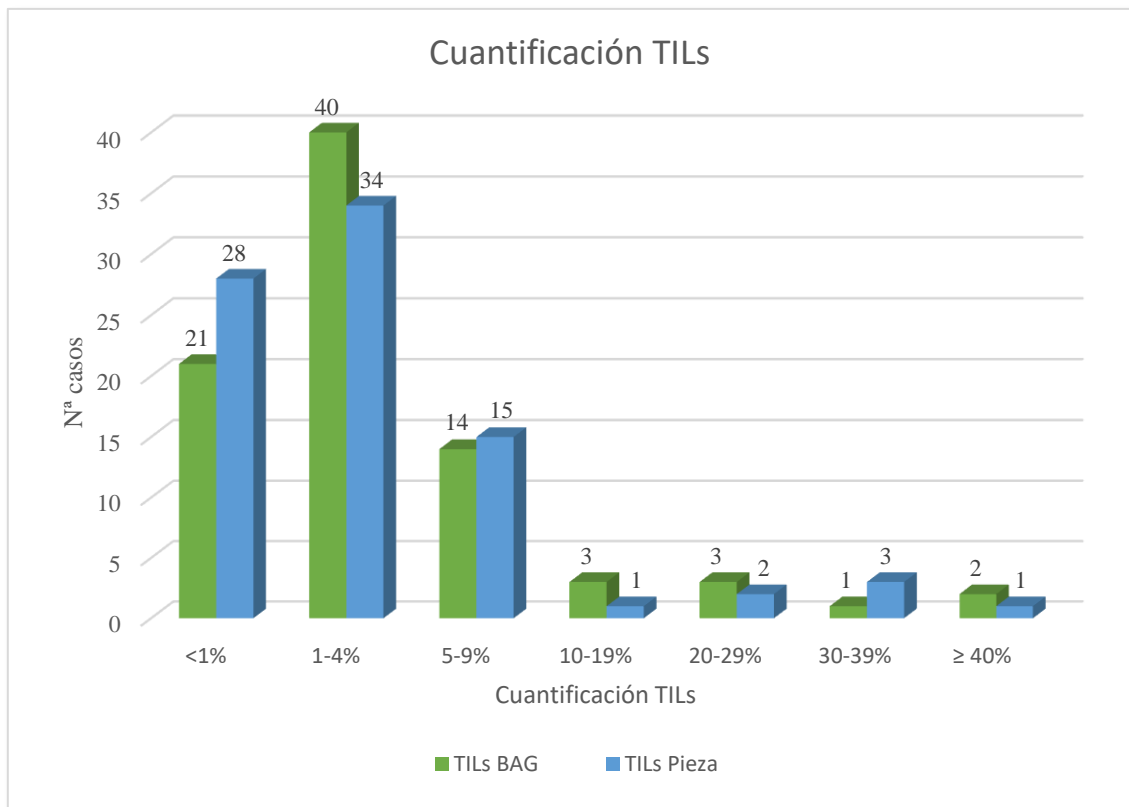


**Figura 11:** GH en BAG y Pieza de exéresis quirúrgica.

El análisis de la correlación del GH entre la BAG y el espécimen quirúrgico demostró una buena correlación para el GH 1 y 2. En el caso del GH3, se observa una mayor incertidumbre, si bien la correlación fue estadísticamente significativa.

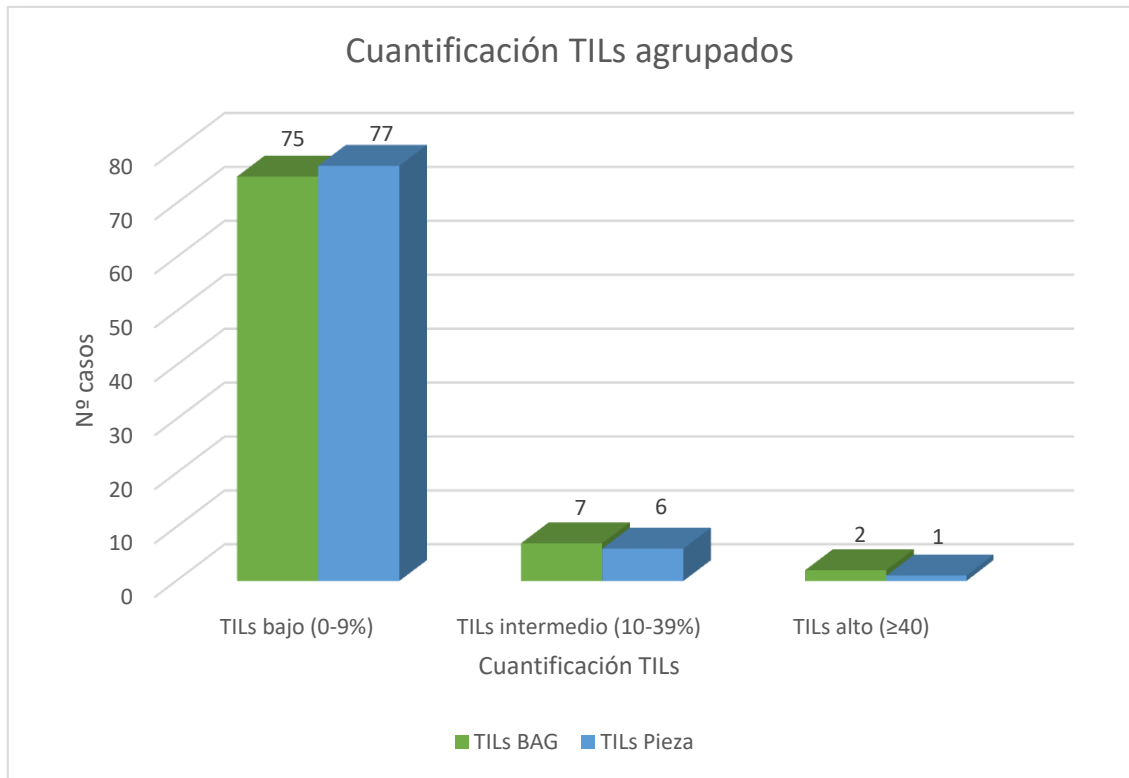
La cuantificación de los TILs la realizamos en la BAG y en la pieza de escisión quirúrgica de cada caso, comparando posteriormente los resultados con un análisis de regresión lineal.

En la Figura 12 se puede observar la distribución de los TILs en la BAG y en la pieza quirúrgica.



**Figura 12:** Distribución de TILs en BAG y en Pieza de exéresis quirúrgica.

Cuando agrupamos los tumores según el porcentaje de TILs, en la BAG, el 89,28 % de los tumores pertenecen al grupo de TILs bajo (0-9%), un 8,3% son tumores con TILs intermedio (10-39%) y sólo un 2,38% presentan un valor de TILs alto ( $\geq 40\%$ ). En la pieza quirúrgica los resultados son similares, un 91,6% de los casos muestran TILs bajo, un 7,1% son tumores con TILs intermedio y un 1,1% tienen TILs alto (Figura 13).



**Figura 13:** Distribución de TILs en BAG y en Pieza de exéresis quirúrgica.

El coeficiente de correlación entre la cuantificación de los TILs en la BAG y en la pieza quirúrgica fue de 0,40, con lo que podemos confirmar que la valoración de los TILs en las BAG se correlaciona con la obtenida en las piezas quirúrgicas.

## 5.2. FACTORES RADIOLÓGICOS Y PATOLÓGICOS

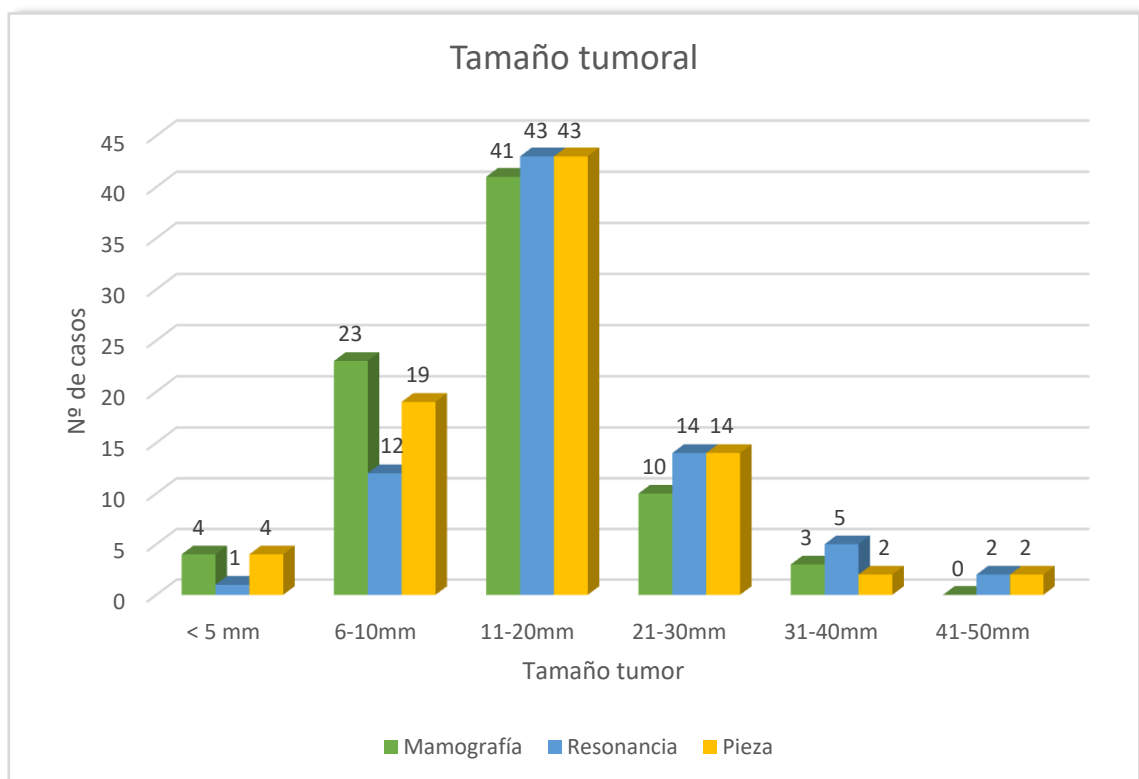
El tamaño del tumor es un factor pronóstico importante en el CM. Preoperatoriamente se valora, en la mayor parte de los casos, con la mamografía y en muchos casos también con la resonancia magnética. En nuestro Hospital se realizan ambas pruebas de forma rutinaria, excepto si existen causas de contraindicación de la realización de la resonancia (portadoras de marcapasos, claustrofobia, etc).

El tamaño del tumor al diagnóstico se midió tanto en la mamografía como en la resonancia de mama expresándolo en milímetros, comparando el resultado con el tamaño patológico en la pieza de exéresis quirúrgica. Teniendo en cuenta los criterios de



la clasificación TNM, consideramos como tamaño el mayor diámetro informado. En el caso de los tumores T2, los dividimos en 3 grupos, ya que se trata de una medida amplia que oscila entre 20 y 50 mm.

La mayoría de los CM fueron T1, tanto en la mamografía (81%), como en resonancia (67%) y en la pieza quirúrgica (78%). Sin embargo, en nuestro estudio, aunque incluimos tumores T2, sólo un 2% presentaron un tamaño entre 41-50 mm (Figura 14).



**Figura 14:** Tamaño tumoral según Mamografía, RM y en Pieza de exéresis quirúrgica.

En el análisis de regresión lineal, el coeficiente de correlación del tamaño del tumor de la imagen mamográfica con el tamaño patológico fue de 0,79, mientras que comparando éste con el tamaño de la resonancia, el coeficiente de correlación fue algo menor (0,67). Esto significa que el tamaño del tumor en la mamografía se acerca más al tamaño patológico, si bien en ambos casos (mamografía y resonancia) la correlación con el tamaño patológico fue estadísticamente significativa.

### 5.3. TILs Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, RADIOLÓGICAS Y PATOLÓGICAS

En el análisis univariante para estudiar la correlación de TILs con los parámetros clínicos, sólo encontramos una diferencia estadísticamente significativa entre el valor de TILs y el IMC, siendo las pacientes obesas las que presentan un mayor porcentaje de TILs en el CM (Tabla 10).

Tabla 10: Correlación TILs con características clínicas (nº casos).

VARIABLES CLÍNICAS	CUANTIFICACIÓN DE TILs			P
	Bajo	Intermedio	Alto	
<b>Estado hormonal</b>				
Premenopáusica	29	3	0	0,705
Postmenopáusica	42	4	1	
<b>Paridad</b>				
Sí	66	6	2	0,857
No	9	1	0	
<b>Lactancia</b>				
Sí	42	5	1	0,308
No	13	0	1	
<b>ACHO</b>				
Sí	39	6	1	0,228
No	36	1	1	
<b>Patología Mamaria</b>				
No	58	4	2	0,603
Benigna	14	2	0	
Maligna	3	1	0	
<b>Otras neoplasias</b>				
Sí	5	0	0	0,707
No	67	6	2	
<b>Antecedentes familiares</b>				
Sí- Primer grado	13	0	0	0,199
Sí- Segundo grado	17	4	0	
No	45	3	2	
<b>IMC</b>				
Bajo	4	0	0	0,018
Normal	26	6	0	
Sobrepeso	30	0	0	
Obesidad	15	1	2	
<b>Comorbilidades</b>				
Sí	48	2	2	0,097
No	27	5	0	
<b>Consumo de alcohol</b>				
Sí	4	0	0	0,777
No	71	7	2	
<b>Hábito tabáquico</b>				
Sí	14	1	0	0,622
No	42	3	2	
Exfumadora	19	3	0	

Respecto a las variables radiológicas estudiadas preoperatoriamente, no encontramos relación del tipo de imagen de la lesión con la cuantificación de TILs, pero sí una asociación estadísticamente significativa entre la cuantificación de TILs y el tamaño del tumor por mamografía y con el tamaño por resonancia (Tabla 11). Es decir, los tumores con mayor tamaño mostraron una cuantificación de TILs mayor que los de tamaño menor.

**Tabla 11: Correlación TILs con características radiológicas (nº casos).**

VARIABLES RADIOLÓGICAS	CUANTIFICACIÓN DE TILs			P
	Bajo	Intermedio	Alto	
<b>Imagen Radiológica</b>				0,683
Nódulo	56	6	2	
Distorsión	13	0	0	
Microcalcificaciones	6	1	0	
<b>Tamaño Mamografía</b>	72	7	2	0,001
<b>Tamaño RM mama</b>	69	7	1	0,009

En relación con los parámetros histológicos, encontramos diferencias estadísticamente significativas entre la cuantificación de TILs con el GH y con la presencia de necrosis (Tabla 12). Los tumores con un GH mayor y con necrosis presentaron una cuantificación de TILs más elevada.

**Tabla 12: Correlación TILs con características histológicas de las BAG (nº casos).**

VARIABLES HISTOLÓGICAS	CUANTIFICACIÓN DE TILs			P
	Bajo	Intermedio	Alto	
<b>E-cadherina</b>				0,178
Positiva	65	7	1	
Negativa	10	0	1	
<b>Grado Histológico</b>				0,001
1	30	3	0	
2	44	2	1	
3	1	2	1	
<b>Presencia de CDIS</b>				0,691
Sí	20	2	0	
No	55	5	2	
<b>Presencia de necrosis</b>				0,009
Sí	3	0	1	
No	72	7	1	
<b>ILV</b>				0,884
Sí	2	0	0	
No	73	7	2	
<b>Invasión perineural</b>				0,941
Sí	1	0	0	
No	74	7	2	

Analizando por separado cada uno de los valores que definen el GH, hubo una diferencia estadísticamente significativa de los TILs con el grado de pleomorfismo nuclear y el número de mitosis (Tabla 13). Los tumores con mayor pleomorfismo y mitosis fueron los que mostraron mayor cuantificación de TILs.

**Tabla 13: Correlación TILs y GH de las BAG (nº casos).**

GH	CUANTIFICACIÓN DE TILs			P
	Bajo	Intermedio	Alto	
<b>Formación de túbulos</b>				0,865
1	6	1	0	
2	16	1	0	
3	52	5	2	
<b>Pleomorfismo</b>				0.001
1	11	1	0	
2	59	3	0	
3	5	3	2	
<b>Mitosis</b>				0,001
1	72	5	0	
2	3	2	2	
3	0	0	0	

Estudiamos la posible relación de los distintos marcadores inmunohistoquímicos realizados de forma rutinaria en las BAG en nuestro Hospital con la cuantificación de TILs en la misma muestra. Sólo encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los valores de TILs y RE, Bcl2 y CK5/6 (Tabla 14). Los tumores con expresión de RE y Bcl2 se asocian a una cuantificación de TILs baja.

Tabla 14: Correlación TILs y parámetros inmunohistoquímicos de las BAG (nº casos).

ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO	CUANTIFICACIÓN DE TILs			P
	Bajo	Intermedio	Alto	
<b>RE</b>				0,016
Positivos	72	6	1	
Negativos	3	1	1	
<b>RP</b>				0,059
Positivos	65	4	1	
Negativos	10	3	1	
<b>RA</b>				0,772
Positivos	69	6	2	
Negativos	6	1	0	
<b>Ki-67 %</b>				0,162
<20	56	3	1	
≥20	19	4	1	
<b>P53</b>				0,418
Positivo	19	3	0	
Negativo	56	4	2	
<b>Bcl2</b>				0.016
Positivo	72	6	1	
Negativo	3	1	1	
<b>CK 5/6</b>				0,001
Positiva	1	0	1	
Negativa	71	7	1	
<b>CK 14</b>				0,884
Positiva	2	0	0	
Negativa	73	7	2	
<b>HER2</b>				0,672
Positivo	10	1	1	
Negativo	63	6	1	

Y teniendo en cuenta la clasificación molecular subrogada, también valoramos la relación de los distintos tipos con la cuantificación de TILs (Tabla 15). La mayoría de los subtipos Luminal (A y B) presentaron una cuantificación de TILs baja.

Tabla 15: Correlación TILs y tipos moleculares (n° casos).

TIPO MOLECULAR	CUANTIFICACIÓN DE TILs			P
	Bajo	Intermedio	Alto	
Luminal A	53	4	1	0,013
Luminal B	17	2	0	
TN	2	0	0	
HER2	1	1	1	

En el ANEXO 8.2. de Microfotografías se encuentran ejemplos de algunos de los CM estudiados (Figuras 15 a 21).

#### 5.4. PACIENTES CON GANGLIO CENTINELA POSITIVO VS GANGLIO CENTINELA NEGATIVO

En nuestro estudio dividimos las pacientes en 2 grupos según la carga tumoral por OSNA. Un grupo corresponde a los casos con GC positivo, considerando únicamente aquellos con afectación macrometastásica y excluyendo las pacientes con afectación micrometastásica o con células tumorales aisladas, en las que no se realiza nunca LA, independientemente de la cirugía que se haya realizado a nivel de la mama. El otro grupo lo constituyen pacientes con GC negativo. Todas las pacientes del grupo con GC positivo fueron sometidas a LA y se valoraron por separado los casos en los que hubo GNC con afectación metastásica (macrometástasis, micrometástasis y células tumorales aisladas) y los casos en los que todos los GNC fueron negativos.

La identificación del GC en el quirófano se realizó buscando el ganglio previamente marcado con TC <sup>99m</sup>. En 47 casos sólo se identificó y se extirpó un GC (56%), en 28 casos se identificaron 2 GC y en 9 casos se extirparon más de 3 GC.

Teniendo en cuenta todos los valores que conocíamos preoperatoriamente, estudiamos la posibilidad de que alguno pudiese predecir la afectación del GC.

#### 5.4.1. Variables clínicas y estado del ganglio centinela

Realizamos un análisis de las variables clínicas en el grupo de pacientes con GC negativo y en el de GC positivo (Tabla 16).

No hubo diferencias estadísticamente significativas respecto a la edad de las pacientes entre ambos grupos, siendo la edad media al diagnóstico de 58,29 en el primer grupo (GC negativo) y de 57,86 años en el segundo (GC positivo).

El estado hormonal y el IMC en el momento del diagnóstico del CM no tuvieron relación con el estado del GC.

Encontramos una asociación estadísticamente significativa del grupo de GC negativo con el antecedente personal de CM previo. La edad de la menarquia más tardía se asoció de forma significativa con GC negativo. El consumo de alcohol, entendiendo como tal un hábito diario, se relacionó con afectación del GC. El hábito tabáquico no demostró ninguna asociación con el estado ganglionar.

El resto de las variables clínicas no mostraron ninguna asociación con la afectación o no del GC.

Tabla 16: Correlación características clínicas y estado del GC (n= nº casos).

VARIABLES CLÍNICAS	GC POSITIVO n	GC NEGATIVO n	P
<b>Edad al diagnóstico</b>			
≤50	16	12	0,440
>50	27	29	
<b>Estado hormonal al diagnóstico</b>			
Premenopáusicas	20	17	0,641
Postmenopáusicas	23	24	
<b>Antecedentes tumores malignos</b>			
Sí	1	4	0,352
No	42	37	
<b>Antecedente patología mama</b>			
No	31	33	0,018
Benigna	12	4	
CM	0	4	
<b>Antecedente familiar CM</b>			
Sí	15	19	0,267
No	28	22	
<b>IMC</b>			
<18,5	1	3	0,685
18,5-24,9	16	16	
25-29,9	17	13	
>30	9	9	
<b>Comorbilidades</b>			
Sí	26	26	0,912
No	17	15	
<b>Menarquia (edad media)</b>	12,82	13,17	0,044
<b>Consumo de alcohol</b>			
Sí	4	0	0,045
No	39	41	
<b>Hábito tabáquico</b>			
Sí	9	6	0,256
No	26	21	
Exfumadora	8	14	



#### 5.4.2. Variables radiológicas y estado del ganglio centinela

Las variables radiológicas mostraron un valor predictivo importante (Tabla 17). Los tumores multifocales tienen una alta probabilidad de afectación del GC. La imagen radiológica en forma de nódulo también se asoció con la afectación del GC de manera significativa. Asimismo, encontramos relación con significación estadística entre la afectación del GC y el tamaño tumoral en la resonancia, pero no con el de la mamografía.

Si tenemos en cuenta el tamaño medio del tumor en la resonancia de mama (14,1 mm en GC negativo, frente a 21,1 mm en GC positivo), cuanto mayor sea el tamaño tumoral en la resonancia, el riesgo de GC positivo es mayor.

El tamaño tumoral medio en la mamografía en el grupo de GC negativo fue de 12,9 mm y en el grupo GC positivo de 16,8 mm, no existiendo diferencia estadísticamente significativa.

Tabla 17: Correlación características radiológicas y estado del GC (n= n° casos).

VARIABLES RADIOLÓGICAS	GC POSITIVO n	GC NEGATIVO n	P
<b>Focalidad</b>			0,001
Unifocal	35	35	
Multifocal	8	0	
Multicéntrico	0	6	
<b>Imagen mamografía</b>			0,032
Nódulo	29	35	
Distorsión	11	2	
Microcalcificaciones	3	4	
<b>Tamaño mamografía (mm)</b>			0,169
T1a (1-5)	1	2	
T1b (>5-10)	7	16	
T1c (>10-20)	24	17	
T2 (>20-30)	6	4	
T2 (>30-40)	2	1	
T2(>40-50)	0	0	
<b>Tamaño RM (mm)</b>			0,026
T1a (1-5)	0	1	
T1b (>5-10)	2	10	
T1c (>10-20)	21	22	
T2 (>20-30)	10	4	
T2 (>30-40)	4	1	
T2 (>40-50)	2	0	

#### 5.4.3. Variables anatomopatológicas y estado del ganglio centinela

En el análisis de las distintas variables patológicas que conocíamos preoperatoriamente, no hubo diferencias significativas entre el CM tipo ductal o tipo lobulillar en relación con la afectación o no del GC. Tampoco hubo asociación entre el resto de los parámetros estudiados y el estado del GC, excepto para los RP, cuya negatividad de asoció con la afectación del GC (Tabla 18).

Tabla 18: Correlación variables anatomopatológicas y estado del GC (n= n° casos).

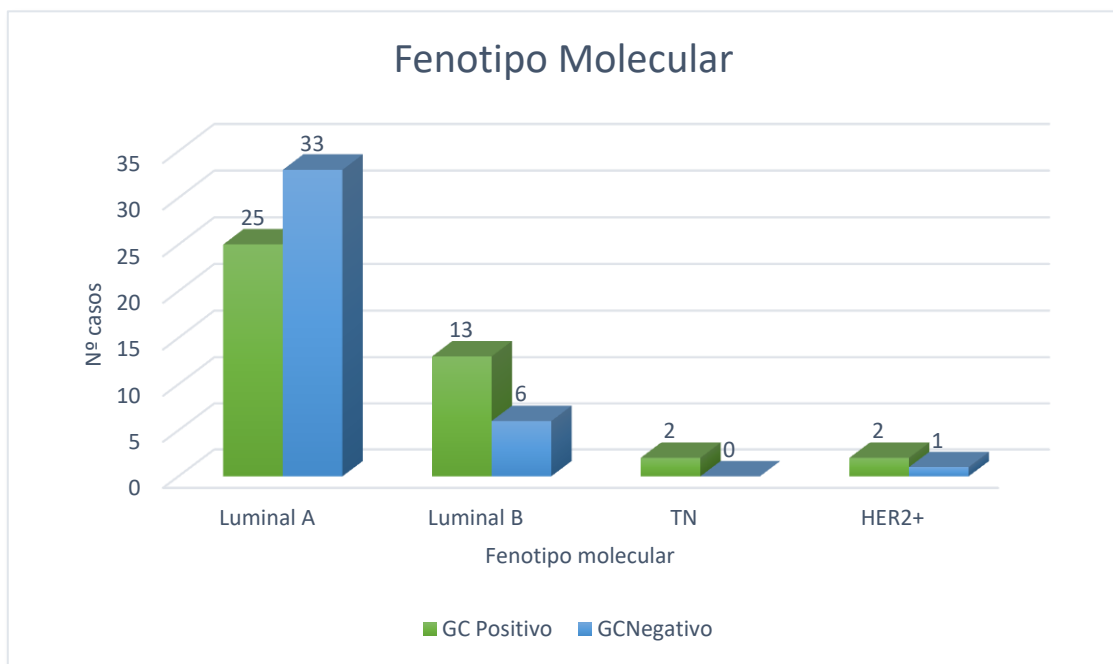
VARIABLES PATOLÓGICAS	GC POSITIVO n	GC NEGATIVO n	P
<b>Tipo histológico</b>			
Ductal	39	34	0,291
Lobulillar	4	7	
<b>Presencia de CDIS</b>			
Sí	13	9	0,388
No	30	32	
<b>Presencia de necrosis</b>			
Sí	2	2	0,961
No	41	39	
<b>GH</b>			
1	16	17	0,605
2	24	23	
3	3	1	
<b>ILV</b>			
Sí	2	0	0,162
No	41	41	
<b>Invasión perineural</b>			
Si	1	0	0,326
No	42	41	
<b>RE</b>			
Positivos	39	40	0,184
Negativos	4	1	
<b>RP</b>			
Positivos	32	38	0,025
Negativos	11	3	
<b>RA</b>			
Positivos	38	39	0,263
Negativos	5	2	
<b>Ki-67 %</b>			
<20	36	36	0,593
≥20	7	5	
<b>P53</b>			
Positivo	12	12	0,531
Negativo	10	29	
<b>Bcl2</b>			
Positivo	39	40	0,184
Negativo	4	1	
<b>CK 5/6</b>			
Positiva	1	1	0,819
Negativa	41	38	
<b>CK 14</b>			
Positiva	2	0	0,162
Negativa	41	41	
<b>HER2</b>			
Positivo	6	6	0,995
Negativo	36	34	

En relación con los parámetros para establecer el GH tumoral, considerando sólo las mitosis, un número mayor de mitosis se asoció a una posibilidad mayor de GC positivo, con tendencia a la significación estadística (Tabla 19).

**Tabla 19: Mitosis y estado del GC (n= n° casos).**

MITOSIS (N°/10CGA)	GC POSITIVO n	GC NEGATIVO n	P
1	37	40	0,056
2	6	1	
3	0	0	

No se encontró relación significativa entre el estado del GC y el fenotipo molecular del tumor ( $p>0,113$ ) (Figura 22).

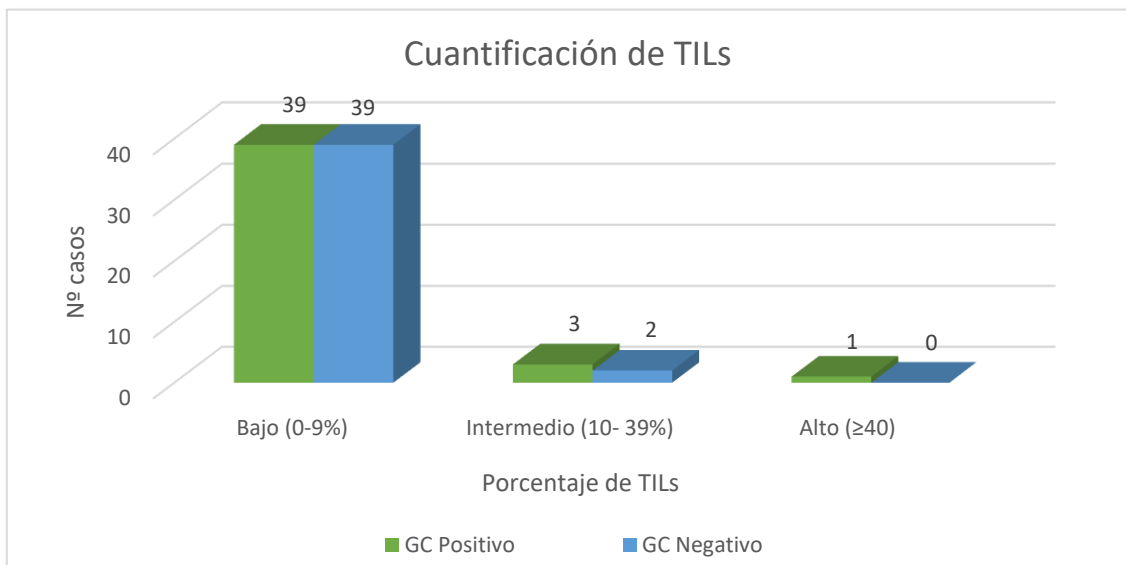


**Figura 22: Fenotipo molecular y estado del GC.**

#### 5.4.4. Infiltrado linfocitario tumoral y estado del ganglio centinela

Los TILs se analizaron como una variable cuantitativa. Con la distribución del infiltrado linfocitario tumoral en la BAG se realizó una curva de ROC, para estimar el punto de corte más sensible y específico para las pacientes del grupo de GC positivo y GC negativo y con un área bajo la curva de 0,46, no encontrando ningún punto de corte que discriminase los 2 grupos.

También realizamos un análisis considerando tres grupos predefinidos de TILs: bajo (0-9%), intermedio (10-39%) y alto ( $\geq 40$  %). Tampoco encontramos asociación entre el porcentaje de TILs y la afectación del GC ( $p > 0,562$ ). En la mayoría de los casos, tanto en el grupo de GC positivo como en el de GC negativo, el valor de los TILs es bajo (Figura 23).

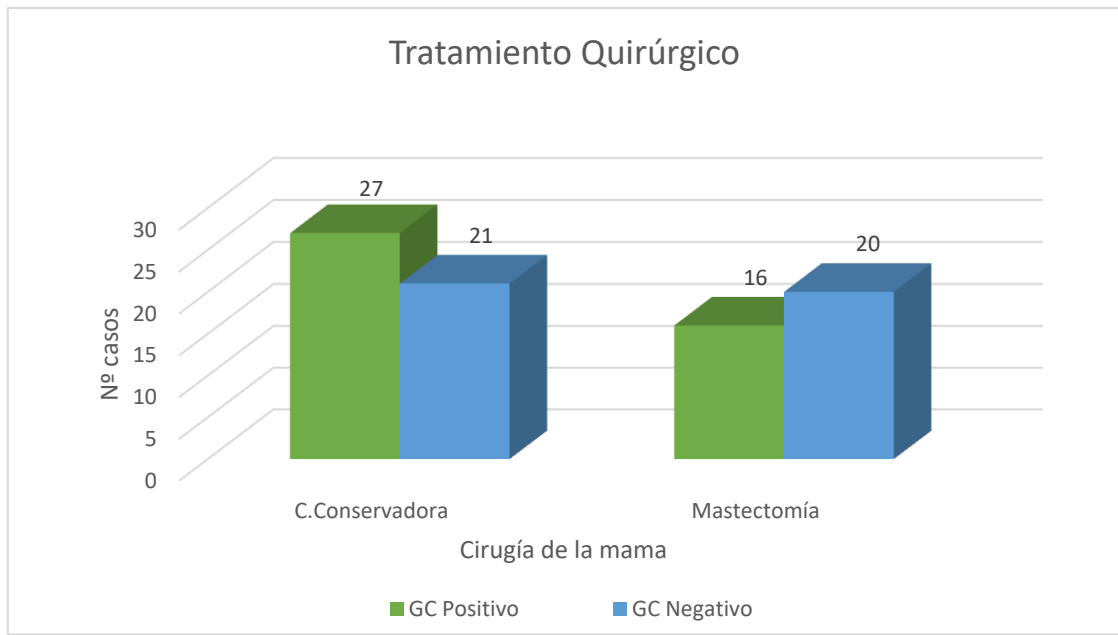


**Figura 23:** TILs y estado del GC.

No hubo una diferencia de TILs estadísticamente significativa entre las pacientes con GC negativo y GC positivo, siendo la media de TILs de 4% y de 5,2% respectivamente.

### 5.5. TRATAMIENTO QUIRÚRGICO DE LA MAMA Y DE LA AXILA

El procedimiento quirúrgico (conservador vs radical) realizado a nivel de la mama fue independiente de la afectación del GC (Figura 24).



**Figura 24:** Tratamiento quirúrgico de la mama y estado del GC.

Una de las principales comorbilidades en los casos de la LA por GC positivo es la aparición de linfedema. En nuestro estudio se demuestra una tendencia a la asociación entre la LA y la aparición de linfedema, aunque no fue estadísticamente significativa ( $p > 0,056$ ) (Figura 25).

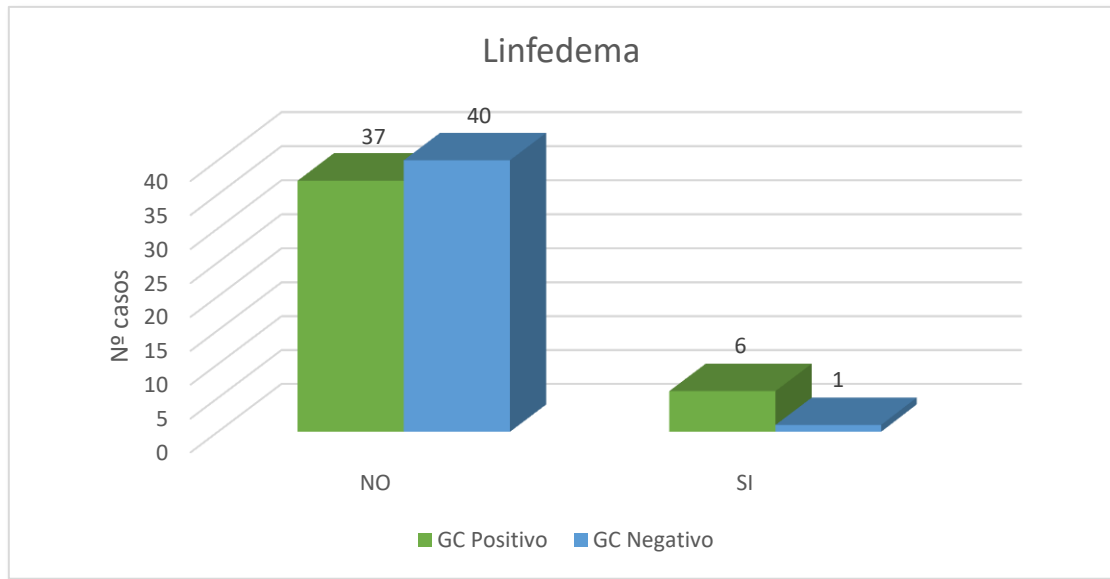
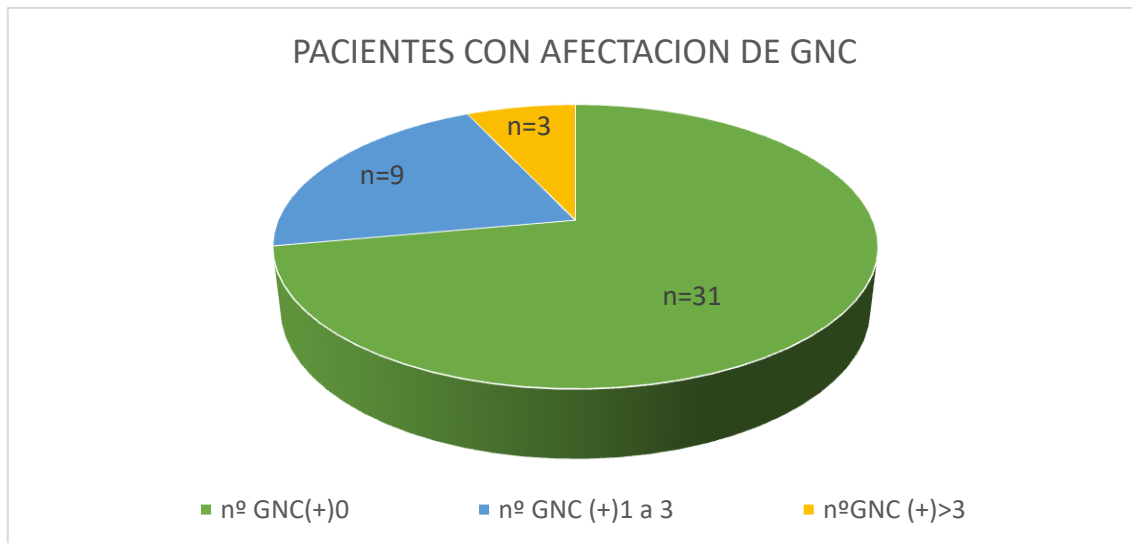


Figura 25: Linfedema y estado del GC.

#### 5.6. PACIENTES CON GANGLIOS NO CENTINELA POSITIVOS VS GANGLIOS NO CENTINELA NEGATIVOS

De los 43 casos con GC positivo, en 30 casos sólo tenían un GC afecto (70%), en 11 casos tenían 2 GC afectados (25%) y sólo en 2 casos presentaron 3 o más GC positivos (5%). En todos los casos se realizó la LA, en 13 casos se aislaron 10 o menos ganglios (30%) y en los 30 casos restantes se aislaron más de 11 ganglios (70%). En el estudio patológico de las muestras axilares, en 31 casos no hubo afectación de ningún otro ganglio, lo que constituye el 72 % de los casos. En un 28% hubo afectación de otros GNC, en 9 casos entre 1 a 3 ganglios (21%) y sólo en 3 casos fueron 4 o más ganglios los afectados (7%) (Figura 26).

Estudiamos si el número de GC positivos tenía relación con la posible afectación de GNC y no se observó una relación estadísticamente significativa ( $p > 0,505$ ).



**Figura 26** Afectación de GNC en la LA (n=nº casos).

### 5.6.1. Variables clínicas y afectación de ganglios no centinela

Teniendo en cuenta las variables clínicas que en nuestro estudio se identificaron como predictores de afectación del GC, se realizó un estudio multivariante para ver si se correlacionaban con una mayor probabilidad de afectación de GNC. Ninguna de las variables clínicas estudiadas y que tuvieron relación con la afectación del GC se asociaron con la afectación de GNC (Tabla 20).

**Tabla 20:** Variables clínicas y estado de GNC (n= nº casos).

VARIABLES CLÍNICAS	GNC POSITIVOS n	GNC NEGATIVOS n	P
<b>Antecedente de patología mama</b>			0,307
No	10	21	
Benigno	2	10	
Cáncer de mama	0	0	
<b>Menarquia (edad media)</b>	12,5	11,6	0,116
<b>Consumo de alcohol</b>			0,692
Si	1	3	
No	11	28	



### 5.6.2. Variables radiológicas y afectación de ganglios no centinela

Las variables radiológicas de focalidad tumoral, tipo de imagen radiológica, así como el tamaño del tumor tanto en mamografía como en resonancia de mama que estaban relacionadas con la afectación del GC, no mostraron asociación con la afectación de los GNC (Tabla 21).

Tabla 21: Variables radiológicas y estado de GNC (n= nº casos).

VARIABLES RADIOLÓGICAS	GNC POSITIVOS n	GNC NEGATIVOS n	P
<b>Focalidad</b>			0,607
Unifocal	10	25	
Multifocal	2	6	
Multicéntrico	0	0	
<b>Imagen Mamografía</b>			0,252
Nódulo	8	21	
Distorsión	2	9	
Microcalcificaciones	2	1	
<b>Tamaño Mamografía (mm)</b>			0,508
T1a (1-5)	0	1	
T1b (>5-10)	1	6	
T1c(>10-20)	7	17	
T2 (>20-30)	3	3	
T2 (>30-40)	0	2	
T2 (>40-50)	0	0	
<b>Tamaño RM (mm)</b>			0,507
T1a (1-5)	0	0	
T1b (>5-10)	0	2	
T1c (>10-20)	6	15	
T2 (>20-30)	3	7	
T2 (>30-40)	0	4	
T2 (>40-50)	1	1	

### 5.6.3. Variables anatómo-patológicas y afectación de ganglios no centinela

Al estudiar las variables anatomopatológicas que en nuestro estudio podían predecir el estado del GC, ni el GH ni el número de mitosis mostraron asociación con la afectación de los GNC.

La negatividad de los RP se asoció a una mayor probabilidad de afectación del GC, pero no presentó relación significativa con la afectación de GNC. Al contrario, encontramos un mayor número de casos sin afectación de GNC en pacientes con RP negativo.

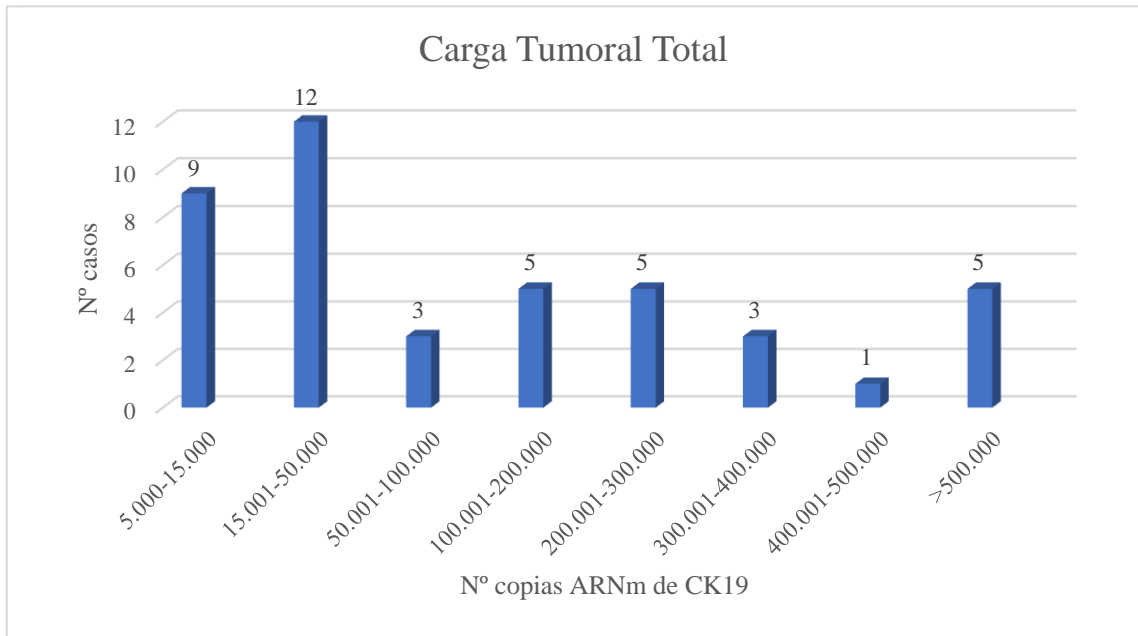
Tampoco la ILV, que analizamos en cada BAG, se asoció con la afectación de GNC (Tabla 22).

Tabla 22: Variables anatomopatológicas y estado de GNC (n= nº casos).

VARIABLES PATOLÓGICAS	GNC POSITIVOS n	GNC NEGATIVOS n	P
<b>GH</b>			0,454
1	4	12	
2	8	16	
3	0	3	
<b>Mitosis</b>			0,455
1	11	26	
2	1	5	
3	0	0	
<b>ILV</b>			0,515
Sí	0	2	
No	12	29	
<b>RP</b>			0,469
Positivos	8	24	
Negativos	4	7	

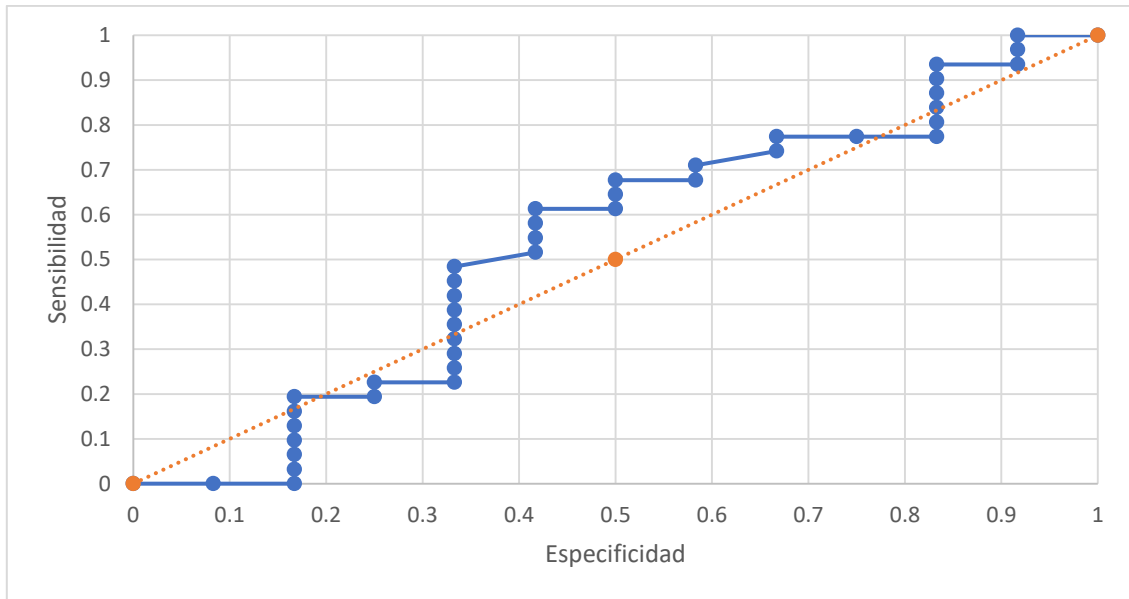
En nuestro Hospital, el análisis del GC se lleva a cabo de forma intraoperatoria mediante el método OSNA. En el periodo de tiempo de los casos que incluimos en nuestro estudio, se realizaba la LA siempre que uno de los GC tuviera una CTT superior

a 5.000 copias de ARNm de CK19. En los casos con LA, la CTT fue desde 5.199 hasta 2.600.001 copias de ARNm de CK19 (Figura 27).



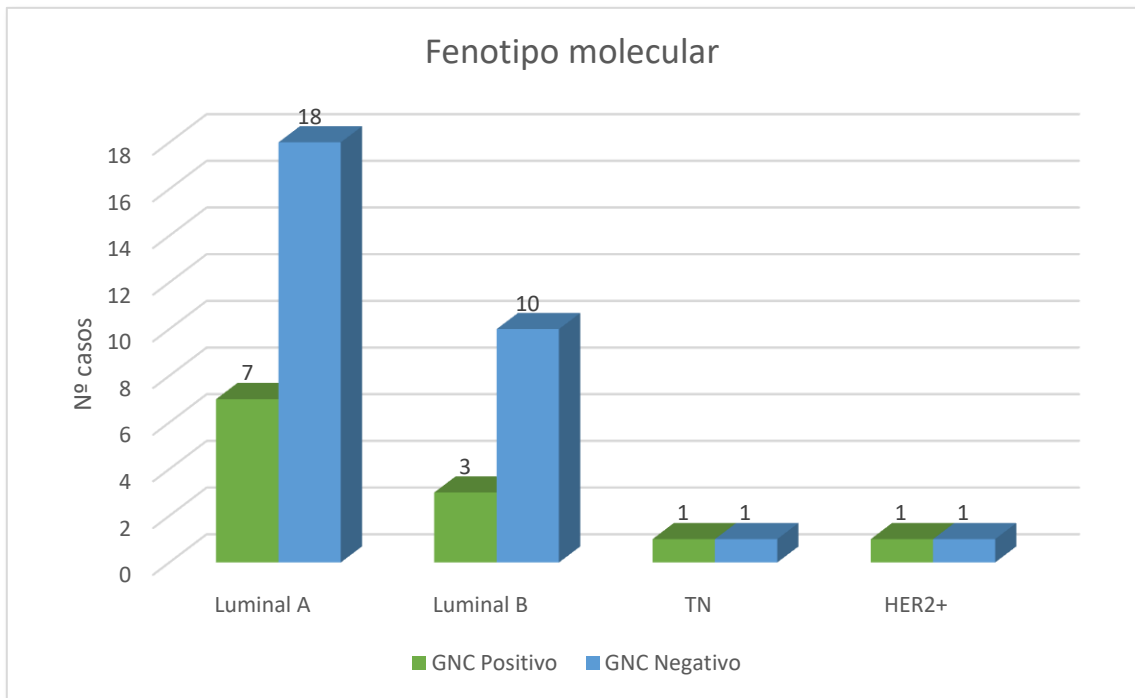
**Figura 27:** CTT de los GC en los casos de LA.

Teniendo en cuenta los valores de la CTT, se realizó una curva de ROC para establecer el punto de corte más sensible para poder predecir la afectación de GNC. Con un área bajo la curva de 0,534 nuestro punto de corte fue de 44.424, con una sensibilidad del 61% y una especificidad del 41%. (Figura 28).



**Figura 28:** Curva de ROC de la CCT.

La mayoría de los tumores Luminales en los que se realizó LA no tuvieron afectación de GNC (Figura 29). El fenotipo molecular tampoco mostró asociación estadísticamente significativa con la afectación de los GNC en la LA.



**Figura 29:** Fenotipo molecular y estado de GNC.

#### 5.6.4. Infiltrado linfocitario tumoral y afectación de ganglios no centinela

La valoración de los TILs en la BAG según los 3 grupos anteriormente definidos no mostró asociación estadísticamente significativa con la afectación de GNC en la LA (Figura 30).

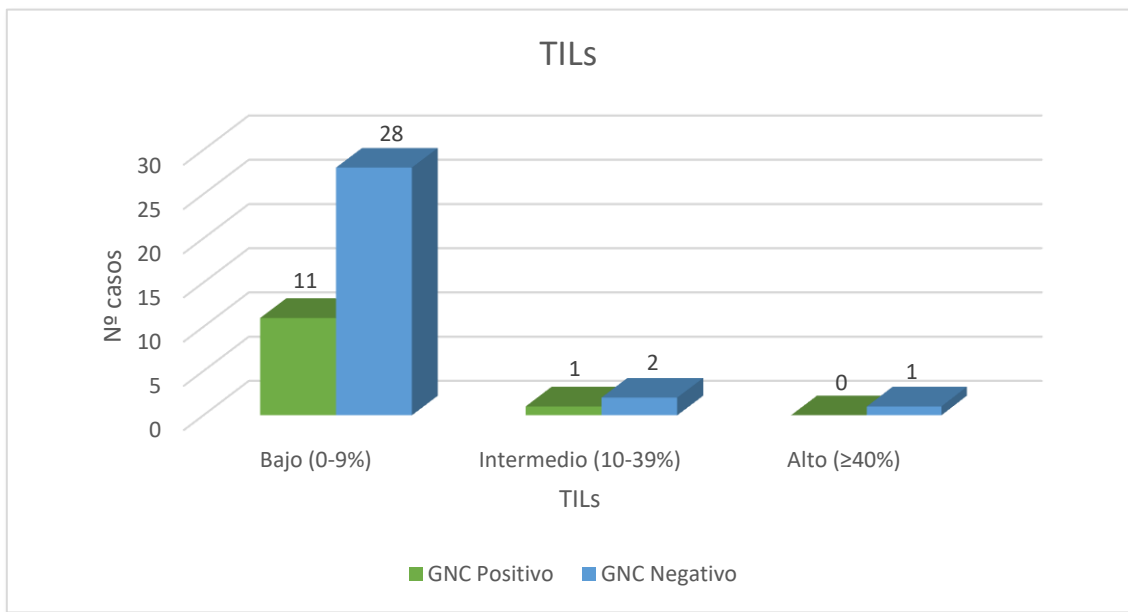


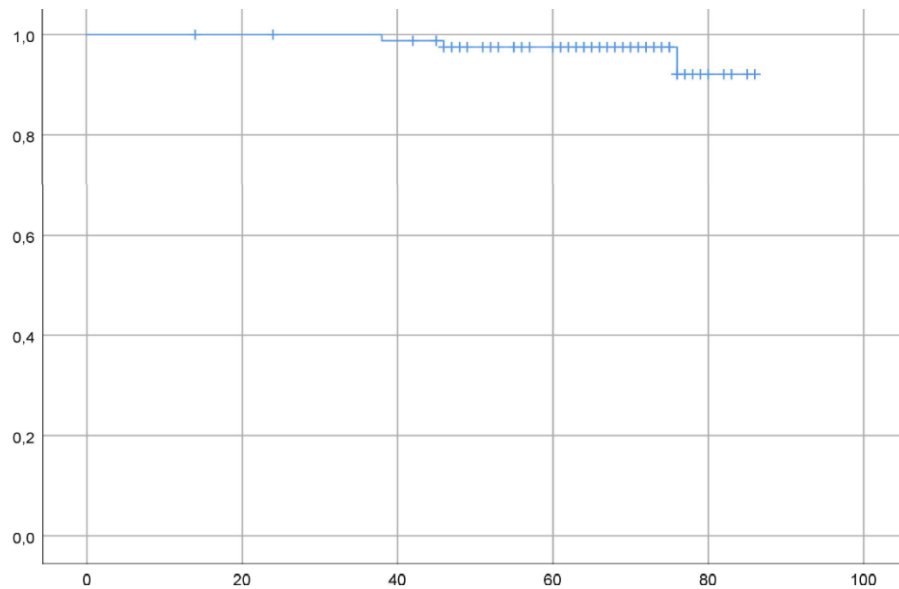
Figura 30: TILs y estado de GNC.

Ya que en nuestro estudio la CTT tiene un valor predictivo de la afectación de GNC con baja sensibilidad, analizamos la posibilidad de que el porcentaje de TILs pudiera aumentarla. En el análisis estadístico se obtuvo un coeficiente de correlación de 0,084, con una  $p > 0,6$ , por lo que no se puede establecer una relación entre la CTT del GC y el valor de TILs para predecir el estado de los GNC.

#### 5.7. SUPERVIVENCIA

La media de seguimiento de nuestras pacientes fue de 65 meses. Durante ese periodo de tiempo hemos observado recaída de la enfermedad únicamente en tres casos,

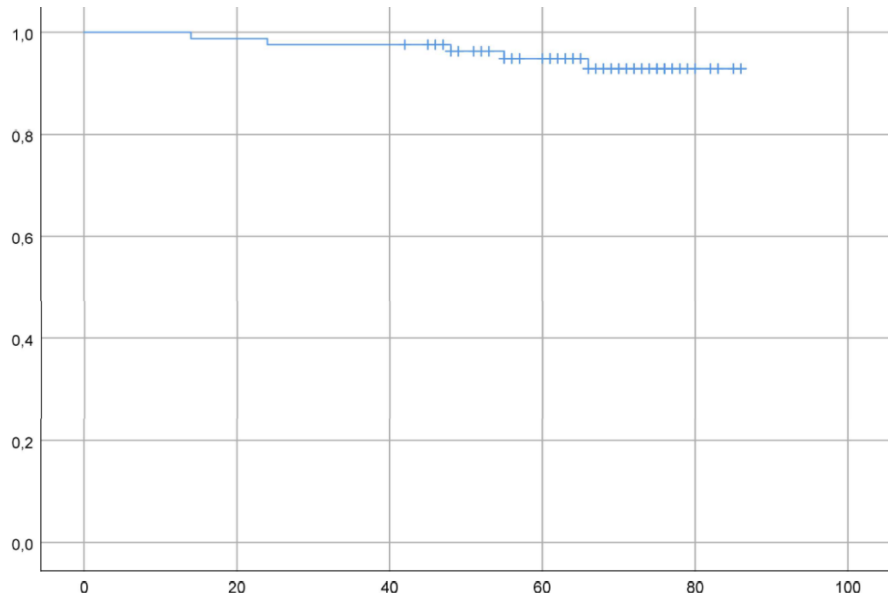
en un caso la paciente falleció por enfermedad metastásica y las otras dos pacientes tuvieron recaídas a nivel local y siguen vivas. La paciente que falleció había tenido CM con afectación axilar y los otros dos casos no. La estimación de la media de supervivencia libre de enfermedad fue de 84 meses (Figura 31).



X: Meses / Y: Probabilidad de supervivencia

**Figura 31:** Supervivencia libre de enfermedad.

Otras cuatro pacientes fallecieron durante el seguimiento por causas no atribuibles al CM. La estimación de supervivencia global fue de 83 meses (Figura 32).



X: Meses / Y: Probabilidad de supervivencia

**Figura 32:** Supervivencia global.

# 6

## Discusión

---



## 6. DISCUSIÓN

---

En la actualidad, la BSGC es la técnica estándar para conocer el estado de los ganglios linfáticos regionales y continúa siendo uno de los principales factores pronósticos del CM, decisivo para la planificación terapéutica de las pacientes. La puesta en marcha de los programas de cribado poblacional y la mayor concienciación de las mujeres han permitido el diagnóstico de la enfermedad en etapas más precoces y, por tanto, sin afectación o con mínima afectación ganglionar. Para la correcta estadificación es necesaria la realización del GC que, hasta en un 70% de los casos tras su análisis patológico, no está afectado, evitándose así la LA. Además, el estudio del GC permite tener la información oncológica necesaria para planificar los tratamientos complementarios.

Cuando se realiza la LA, en los casos en que se demuestra la positividad del GC, hasta en un 40 -70% no se objetivan otros GNC afectados, con lo cual se está realizando un tratamiento innecesario y con una morbilidad asociada que, teniendo en cuenta la elevada incidencia y prevalencia del CM, tiene un gran impacto social, económico y sanitario. En nuestro estudio de los 43 casos con GC positivo en los que se realizó la LA, sólo 12 casos (28%) casos presentaron afectación de otros GNC coincidiendo con lo descrito en la literatura (6).

En los tiempos de la medicina de precisión, debemos plantearnos qué parámetros clínicos, patológicos y radiológicos podemos conocer antes del tratamiento quirúrgico y que podrían predecir el estado ganglionar, evitando la cirugía o la radioterapia a nivel axilar en los casos de GC positivo. Incluso, en algunos casos, podríamos evitar la BSGC, cuya morbilidad es muy inferior al tratamiento radical de la axila, pero no está exenta de complicaciones (194)(195). Durante el seguimiento de las pacientes de nuestro estudio, un 14% de las sometidas a LA y una paciente en la que se realizó sólo BSGC (2,5%), desarrollaron linfedema, coincidiendo con los datos reflejados en otros estudios, como el de Nguyen y cols. que objetivan el desarrollo de linfedema a los 5

años de seguimiento en un 16% en el caso de LA y en un 5% en los casos de BSGC (137).

La afectación del GC puede ser como células tumorales aisladas, micrometástasis o macrometástasis. El Grupo de Oncología del Colegio Americano de Cirujanos (ACOSOG), realizó un estudio prospectivo (ACOSOG Z0010), diseñado para evaluar la incidencia y el impacto de las micrometástasis y células tumorales aisladas del GC en la supervivencia de las pacientes. Observaron que en el 10,5% de los casos en los que el estudio patológico convencional del GC fue negativo con HE, resultó positivo en el estudio inmunohistoquímico, pero sin impacto en la supervivencia (196). Otros estudios confirmaron estos hallazgos y, por ello, no es preciso realizar tratamiento local a nivel axilar con afectación micrometastásica o con células tumorales aisladas en el GC (197) (198).

En el caso de afectación por macrometástasis del GC, existe aún gran controversia sobre la actitud terapéutica a seguir. A finales de la década de los 90, ACOSOG realizó un ensayo multicéntrico aleatorizado fase III (ACOSOG Z0011) para determinar el impacto de la LA en la supervivencia global, en pacientes con GC metastásico, tratadas con tumorectomía, terapia sistémica adyuvante y radioterapia de campo tangencial. Se incluyeron 895 pacientes, de 115 hospitales, con CM invasivo  $\leq 5$  cm, sin adenopatías palpables y con 1-2 GC metastásicos, asignando al azar un grupo para LA y otro sin LA ni irradiación ganglionar de tercer campo. Con una mediana de seguimiento de 6,3 años, no encontraron diferencias estadísticamente significativas en supervivencia global ni en la supervivencia libre de enfermedad (199). La debilidad de este ensayo, en relación con los criterios de inclusión y la metodología, supuso el inicio de múltiples estudios posteriores para la búsqueda de marcadores que permitiesen evitar el tratamiento quirúrgico y radioterápico local a nivel axilar.

Se dispone de poca información sobre la irradiación ganglionar completa después de un GC positivo sin LA. La Organización Europea para la Investigación y el Tratamiento del Cáncer (EORTC) iniciaron en el año 2001 el estudio AMAROS, un ensayo aleatorizado y multicéntrico de fase III de no inferioridad que compara, en los casos de GC metastásico, el tratamiento sólo con la LA o con irradiación axilar. Los resultados preliminares a 5 años demuestran que la LA y la irradiación axilar después de

un GC metastásico proporciona un buen control local en pacientes con CM T1-T2, sin diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos en recurrencia axilar, supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global. Sin embargo, encontraron diferencias significativas en la incidencia de linfedema a favor del grupo de irradiación axilar, pero no en la limitación de la movilidad del hombro ni en parámetros relacionados con la calidad de vida (síntomas en el miembro superior, dolor, imagen corporal). Están pendientes de publicar los resultados a 10 años (191).

No debemos olvidar que sigue siendo importante conocer el número de ganglios metastásicos a nivel axilar, ya que es un factor predictivo de recurrencia y supervivencia, con una gran importancia en la toma de decisiones clínicas respecto a la terapia adyuvante. Hoy en día el único método para conocer con precisión el número de ganglios axilares afectados es la LA (4).

El esfuerzo por encontrar una fórmula de predicción del estado de los GNC en los casos de GC metastásico, se ha realizado de forma casi paralela al desarrollo del estudio del GC. La mayor parte de las aproximaciones al problema se están desarrollando en torno a la “carga tumoral” de afectación del GC, tanto cualitativa como cuantitativa. Desde el año 2002 se han publicado numerosos trabajos cuyo objetivo ha sido la búsqueda de algoritmos que permitan estimar, a partir de la carga tumoral del GC, la probabilidad de afectación de los GNC para omitir el tratamiento locorregional de la axila tanto quirúrgico como radioterápico. Pero ningún estudio ha demostrado de forma concluyente qué algoritmo supondría un beneficio claro para evitar el tratamiento local axilar en casos de GC positivo.

En la revisión bibliográfica, son varios los estudios que buscan una combinación reproducible de variables (edad al diagnóstico, tamaño del tumor, número de GC afectos, ILV, tipo histológico tumoral, etc) que permita establecer la probabilidad de metástasis en los GNC de manera más objetiva.

Uno de los nomogramas más conocido para la elaboración de modelos de predicción es el del *Memorial Sloan Kettering Cancer Center* (MSKCC), en el que se valoran 9 parámetros (tamaño del tumor, tipo de histológico, GH, ILV, multifocalidad, estado del RE, método de detección del GC y el número de GC positivos y negativos),

con un valor para cada uno y con cuya suma se estima el riesgo de afectación de los GNC (200). Sin embargo, en este estudio no se incluyó el tamaño de la metástasis ganglionar, un factor que, en estudios posteriores, ha sido el que se ha identificado como de mayor valor predictivo de afectación metastásica de GNC (201).

En el año 2005 se publica el nomograma de la clínica Mayo, un estudio en colaboración con el Centro Universitario de Michigan, en el que incluyen la relación de GC metastásicos y no afectados, el tamaño de la metástasis en el GC y la afectación extracapsular, obteniendo una tasa menor de falsos negativos (202). En el nomograma de Cambridge también se incluyeron estos dos últimos parámetros del GC, resultando un valor predictivo de afectación de los GNC del 84% (203).

Otros autores incluyen en su análisis más parámetros, además de los referidos en estudios previos, sin llegar a una conclusión clara sobre su valor predictivo de afectación de los GNC (204) (205).

El valor predictivo de todos estos estudios requiere la evaluación de entre cinco a nueve variables, por lo que depende de la exactitud y precisión con que se determine cada variable. Esto hace que sean poco reproducibles y aplicables de forma generalizada.

Con el objetivo de conseguir un modelo predictivo más fácil de aplicar y reproducible en todos los hospitales, Hwang y cols. (206) demostraron que el tamaño del tumor mayor de 2 cm, la afectación del GC mayor de 2 mm y la presencia de ILV eran factores predictivos de GNC metastásicos.

Barranger y cols. (207) en un análisis prospectivo multivariante concluyen que el tamaño histológico del tumor, el tamaño de la metástasis del GC y la proporción entre GC metastásicos y GC aislados son factores predictivos de afectación de GNC en la LA.

Posteriormente, el grupo de Standford, al igual que Hwang y cols., define sólo tres variables en relación con la afectación de los GNC: el tamaño del tumor, la ILV y el tamaño de la metástasis del GC (208).

En los distintos grupos se considera el tamaño histológico del tumor como un factor predictivo de afectación de GNC, pero con una gran variabilidad, pues en la mayoría se incluyen tumores desde T1 a T3 y en alguno sólo tumores T1. En nuestro estudio existe una buena correlación entre el tamaño radiológico del tumor y el histológico de la pieza quirúrgica. Sin embargo, no encontramos relación con la afectación de GNC. Esto podría explicarse porque en nuestro estudio sólo incluimos tumores en estadio precoz (T1 y T2).

El tamaño de la afectación del GC es otra variable que en los distintos estudios demuestra su valor como factor predictivo de afectación de GNC, pero se incluye la afectación no sólo por macrometástasis sino también con micrometástasis y células tumorales aisladas.

En nuestro estudio no se incluyeron pacientes con GC con afectación por células tumorales aisladas o por micrometástasis ya que, desde el año 2013, en nuestro Hospital ya no se realiza la LA en estos casos. De las 43 pacientes con GC con macrometástasis, en un 70% de los casos sólo estaba afectado un GC, dos ganglios en un 25% y tres o más ganglios en un 5%. En la LA de estas pacientes, en el 72% de los casos ningún GNC presentó afectación metastásica y en un 28 % hubo GNC afectados y de éstos sólo un 7% con afectación de 4 o más ganglios, coincidiendo con lo que se describe en la literatura. A mayor número de GC afectados parece que existe una mayor probabilidad de afectación de GNC, aunque en nuestro estudio no hemos podido establecer una relación estadísticamente significativa, dado el escaso número de pacientes con afectación de 3 o más GC.

La mayor parte de los modelos de predicción tienen en cuenta factores patológicos que se conocen tras el tratamiento quirúrgico. Por ello, parece importante estudiar posibles factores predictivos del estado ganglionar axilar que se puedan conocer previamente al acto quirúrgico y, así, poder tomar una decisión sobre el tratamiento quirúrgico axilar en el momento de la cirugía del CM, para no someter a la paciente a una segunda cirugía, con la angustia que esta incertidumbre supone para las pacientes. Incluso se podría plantear la posibilidad de evitar la BSGC en tumores infiltrantes de mama precoces con el conocimiento de nuevos factores predictivos (194).

En los nomogramas más conocidos, a los que hemos hecho referencia, no se valora el infiltrado linfocitario tumoral (TILs). Este es un parámetro que podemos conocer en la biopsia percutánea radiológica de la que disponemos previamente a la cirugía. Así mismo, en la mayor parte de esos estudios, el análisis del GC se realiza por examen histológico, con un 30% de falsos negativos.

El objetivo de nuestro estudio fue analizar variables que se pudieran conocer preoperatoriamente o intraoperatoriamente, ya que buscamos que nos faciliten una predicción intraoperatoria del estado ganglionar.

El creciente interés por definir nuevos factores pronósticos y por desarrollar terapias más personalizadas, ha hecho que los estudios no se centren exclusivamente en las células tumorales y la expresión de receptores hormonales y HER2 en el CM, sino también en los elementos celulares que forman parte del estroma tumoral, como son las células inmunes. En los últimos años, ha experimentado un creciente interés el estudio de los TILs en los tumores infiltrantes de mama, demostrándose su valor pronóstico en la supervivencia libre de enfermedad y su valor predictivo para el tratamiento quimioterápico en los tumores TN y HER2 positivos. Los TILs son las células mononucleares inmunes que infiltran el estroma tumoral. La valoración y cuantificación de los TILs se realiza en secciones histológicas teñidas con HE, lo que hace que su análisis sea factible desde el punto de vista asistencial, sin sobrecoste económico. Ya en la década de los 90 del siglo pasado, se hacía referencia al infiltrado inflamatorio como un factor pronóstico, independiente del tamaño del tumor y del estado ganglionar, en relación con la supervivencia de pacientes con CM (209).

La relación entre los TILs y el pronóstico varía según el subtipo de CM. Se ha demostrado que la presencia de un porcentaje alto de TILs se asocia con un pronóstico más favorable en pacientes con CM TN y HER2 positivo en etapas tempranas(8). Así mismo, también se está demostrando el valor pronóstico de los TILs tanto en neoadyuvancia como en adyuvancia (210). Loi S y cols. (211) encontraron que los CM TN con ganglios positivos y con un porcentaje mayor de TILs presentaban mejor supervivencia libre de enfermedad y mayor supervivencia global, independientemente de la quimioterapia recibida, objetivando que cada aumento de un 10% de TILs se asociaba a una reducción del riesgo de recaída y a un riesgo menor de fallecimiento.

Las publicaciones apoyan el valor pronóstico de los TILs en relación con los subtipos moleculares de CM y con la respuesta a distintos esquemas de quimioterapia. Sin embargo, su estudio en el CM precoz, en los subtipos Luminales y su relación con el estado ganglionar apenas ha sido estudiada. Además, la valoración de los TILs no se incluye en ninguno de los nomogramas publicados hasta ahora. Por ello, nos planteamos si los TILs se podrían relacionar con la afectación ganglionar axilar y permitir una selección óptima de las pacientes para la realización de la BSGC y/o la LA.

En la bibliografía, la metodología para analizar los TILs ha sido muy heterogénea, no sólo por el tipo de celularidad inflamatoria que se debía incluir, sino también por su localización y por los intervalos de cuantificación. Unos grupos los valoraban a nivel intratumoral, en el estroma distante al tumor y en el estroma adyacente al tumor (212) (211). Otros analizaban cinco áreas del lecho tumoral y cinco áreas periféricas (213). Y en algunas publicaciones no se especificaba dónde se realizaba la determinación (214).

Respecto a los puntos de corte para cuantificar el infiltrado linfocitario tumoral, en algunas publicaciones han utilizado un sistema dicotómico, diferenciando entre infiltrado linfocitario tumoral alto y bajo, estableciendo un punto de corte en el 20%, en el 50% o en el 60% (211)(181). Otros autores consideran tres puntos de corte, <10%, 10-50% y >50% (215) y algunos hacen una valoración cualitativa en tres niveles, débil, moderado y denso (216). Esta variabilidad en el análisis de los TILs ha dificultado la interpretación y reproducibilidad de los resultados.

Dado el gran interés del valor de los TILs en el CM, el Grupo de Trabajo Internacional del Infiltrado Linfocitario Tumoral en Cáncer de Mama, liderado por Salgado, definió en el año 2014 las recomendaciones para hacer la valoración de los TILs más objetiva y reproducible, estableciendo con claridad la localización del infiltrado, el tipo de células inmunes a analizar, así como las zonas que deben excluirse en el análisis (78). En publicaciones posteriores se aplican estos criterios, pero los puntos de corte siguen mostrando gran variabilidad. Denkert y cols. establecen tres intervalos ( 0-20% ,21-49% y  $\geq$ 50%), pero únicamente incluyen en su estudio tumores TN y HER2 positivos que son los subtipos moleculares que muestran, con mayor frecuencia, presencia de porcentaje de TILs alto (217). Miyoshi y cols. incluyen en su

estudio tumores RE positivos y HER2 negativos y valoran los TILs de manera dicotómica con un punto de corte en el 30% (218). Jang y cols. valoran los TILs en todos los subtipos moleculares y establecen el punto de corte en el 10% (219).

En nuestro estudio limitado a CM precoz, en el que la mayor parte de los tumores son subtipo Luminal, donde no es esperable encontrar un elevado porcentaje de TILs, decidimos establecer tres intervalos (0-9%, >10-39%,  $\geq$ 40%), similares al grupo de Denkert (217).

La cuantificación de los TILs se ha realizado en la pieza de exéresis quirúrgica en la mayoría de los estudios publicados y así se recomienda por el Grupo de Trabajo Internacional del Infiltrado Linfocitario Tumoral en Cáncer de Mama. Posteriormente, al conocerse su valor como factor predictivo en tumores TN y HER2 positivos y en relación con la respuesta la neoadyuvancia, se comenzaron a estudiar en las muestras de biopsia percutánea (217).

Se ha observado que la cuantificación de los TILs presenta diferencias entre la pieza de exéresis quirúrgica y la biopsia percutánea previa, siendo su valor mayor en las muestras de exéresis quirúrgica. Esta diferencia se atribuye a una activación de la respuesta inmune tras la BAG o a la heterogeneidad del tumor ( la diferencia depende de la zona del tumor de donde se obtiene la BAG), sin tener relación con el subtipo tumoral de CM (220).

En nuestro estudio, siguiendo las recomendaciones del Grupo de Trabajo Internacional del Infiltrado Linfocitario Tumoral en Cáncer de Mama, hemos valorado los TILs tanto en la BAG diagnóstica como en la pieza de exéresis quirúrgica, realizando el análisis en todas las secciones de BAG disponibles, así como en una sección completa del tumor de la pieza quirúrgica; evaluando los TILs como una variable continua e indicando su porcentaje en el estroma tumoral. Nuestros resultados, a diferencia de lo publicado por Huang y cols. (220), demuestran que existe una buena correlación entre los TILs de la BAG y de la pieza quirúrgica. Por ello, realizar el análisis de los TILs en la BAG es un valor preoperatorio fiable en concordancia con lo descrito por otros grupos (221).



En la mayor parte de los estudios que siguen los criterios de Salgado para la cuantificación de los TILs, se considera que el infiltrado linfocitario es bajo si es inferior al 10%. Los tumores más inmunogénicos (TN y HER2 positivos) tienen escasa representación en nuestra muestra (2,4%) con un valor de TILs  $> 40\%$  y los tumores Luminales, los más numerosos en nuestro estudio, presentan mayoritariamente un valor de TILs bajo ( $<10\%$ ). Estos resultados coinciden con lo descrito en la literatura (222).

En nuestro trabajo, al comparar el grupo de pacientes con GC positivo frente al grupo con GC negativo, no hubo diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la edad al diagnóstico, estado hormonal, antecedentes familiares de CM, IMC y hábito tabáquico. Sin embargo, sí encontramos una relación estadísticamente significativa entre la afectación del GC y una edad de la menarquia más temprana y en relación con un consumo de alcohol diario. Ambos son factores de mayor riesgo de CM reconocidos (18)(26) y en nuestra serie también suponen un mayor riesgo de afectación axilar. Respecto a los antecedentes personales de patología mamaria, está demostrado que las mujeres que tuvieron un CM tienen riesgo mayor de desarrollar otro CM (14). Estas pacientes presentaron menos probabilidad de afectación axilar en nuestro estudio. Este resultado apoyaría el beneficio del seguimiento de las pacientes con CM, pues el diagnóstico de un nuevo tumor se realiza en un estadio más precoz, precisamente por el control más estricto con mamografía anual en los casos de antecedente de CM. Todas estas variables clínicas que podemos conocer preoperatoriamente, no están incluidas en ninguno de los nomogramas más conocidos anteriormente descritos. En la mayor parte de ellos sólo hacen referencia al tamaño del tumor como variable “clínica”, pero realmente se refieren al tamaño del tumor tras el estudio histológico. En publicaciones más recientes se hace referencia al tamaño clínico tumoral distinguiéndolo del patológico, sin especificar con claridad el método para su valoración (223) o bien hacen referencia al tamaño determinado por la imagen radiológica, en especial la resonancia (224). En prácticamente todos los centros hospitalarios se conoce el tamaño del tumor por imagen, tanto en mamografía como en resonancia, antes de la cirugía. En nuestro estudio retrospectivo conocíamos el tamaño patológico del tumor y estudiamos qué prueba de imagen se correspondía mejor con el tamaño patológico. Fue el tamaño por mamografía el que mostró una mayor correlación (0,79) con el tamaño patológico. La correlación con la resonancia fue algo inferior (0,67), pero la diferencia no resultó

significativa. Por tanto, ambas técnicas radiológicas parecen tener similar exactitud para conocer el tamaño tumoral preoperatoriamente. La mayor parte de nuestros tumores medían entre 5-20 mm, con apenas diferencias en milímetros entre el tamaño radiológico y patológico. Esto demuestra la gran precisión de la medida radiológica, debido en gran parte a la experiencia de los radiólogos de patología mamaria, lo que nos permite utilizar ambas medidas (mamográfica y de resonancia) con seguridad. Al igual que en la mayor parte de los estudios objetivamos que un tamaño mayor del tumor por resonancia se asocia con un mayor riesgo de afectación del GC.

Respecto a la focalidad y a la morfología o tipo de lesión radiológica, observamos que los tumores multifocales y los que se definen como distorsión radiológica presentan un mayor riesgo de afectación del GC. La multifocalidad está relacionada con un mayor riesgo de afectación de GNC (200)(205), pero no hay referencias de la existencia de relación entre el tipo de imagen radiológica y el estado ganglionar.

Ninguna de las variables patológicas analizadas en las BAG de nuestro estudio mostró asociación con el estado del GC, a excepción de los tumores con negatividad de los RP (tumores Luminal B) que tiene un mayor riesgo de afectación del GC. La ILV se relaciona en diversos estudios con el estado ganglionar, pero analizada en las piezas de exéresis quirúrgica. La valoración de la ILV la realizamos sólo en las BAG y la identificamos únicamente en dos casos, lo cual puede explicar por qué no se asocia con la afectación ganglionar en nuestro estudio.

Aunque no encontramos asociación entre el GH y el estado del GC, el número mayor de mitosis en el tumor (parámetro que se incluye en el score del GH) mostró una tendencia a la significación estadística, por lo que es muy probable que con un mayor número de casos se podría demostrar su asociación.

Aplicando la clasificación de Perou (39), más del 90% de los casos fueron Luminales A y B, con la diferencia de que en los casos con GC positivo un 58% fueron Luminales A y un 31% Luminales B; mientras que en los casos con GC negativo, el 80% fueron Luminales A y un 14% Luminales B, sin que la diferencia tuviese significación estadística.

Los patrones moleculares TN y HER2 positivo puro tienen en nuestro estudio una representación, en conjunto, inferior al 10 %. Esto se explica porque en nuestra serie sólo se incluyeron pacientes con CM precoz que no habían recibido neoadyuvancia. En los últimos años en nuestro centro, de acuerdo con la práctica asistencial más normalizada, un porcentaje importante de los tumores HER2 positivo y TN reciben tratamiento neoadyuvante.

La valoración de los TILs en nuestra muestra, como ya comentamos, fue mayoritariamente  $\leq 10\%$  (91% de los casos con TILs bajo) y no encontramos ninguna asociación con el estado del GC. Si tenemos en cuenta el valor medio de los TILs, sí observamos que fue menor en los casos de GC negativo, un 4%, frente a un 5,2% en los casos de positividad del GC. Aunque no hubo una asociación estadísticamente significativa, los tumores que podríamos considerar con mayor capacidad metastásica (TN y HER2 positivo) presentaron mayor valor de TILs. Estos resultados son coincidentes con los de otros estudios, en los que se describe que los tumores Luminales presentan un valor bajo de TILs y, además, menor que en los TN y HER2 positivos (219) (218).

De acuerdo con los criterios de Salgado (78), no se recomienda estudiar los subtipos de células inflamatorias. Sin embargo, esto puede ser prometedor en los tumores Luminales, caracterizados por un valor de TILs bajo, pues la identificación de los distintos tipos de células inflamatorias podría poner de manifiesto diferencias para ayudar a subclasificar este tipo molecular tumoral (225).

Al analizar la relación de los TILs con los distintos parámetros clínicos y patológicos estudiados, encontramos que tanto el pleomorfismo nuclear mayor como el número de mitosis más elevado (se puede decir que tumores con GH mayor) se asocian con un valor de TILs más alto, coincidiendo con lo descrito en otros estudios (218) (219).

Respecto al tamaño tumoral, nuestros resultados coinciden con lo publicado por otros autores, demostrando una relación estadísticamente significativa entre la cuantificación de TILs y el tamaño tumoral mayor, con la diferencia que en nuestro trabajo el tamaño que se analizó fue el de la imagen radiológica preoperatoria y en otros

estudios se hace referencia al tamaño patológico postquirúrgico (219). Esto confirma la gran exactitud y fiabilidad de las pruebas de imagen respecto al tamaño tumoral.

A diferencia de otros estudios, no hemos encontrado una asociación estadísticamente significativa entre el índice de proliferación Ki-67 y el valor de TILs (218) (219). Esto podría explicarse por el hecho de que en estas publicaciones se incluyen tumores TN y HER2 positivo, que se caracterizan por tener valores de TILs más elevados y un índice de proliferación mayor. En nuestro trabajo, la mayor parte de los casos fueron CM RE positivos y HER2 negativos.

Por otro lado, sí hemos encontrado una asociación entre los TILs con la obesidad de las pacientes y la presencia de necrosis en el tumor, parámetros a los que no hace referencia la bibliografía revisada, aunque ambos son factores de mal pronóstico en el CM. La relación con la necrosis se puede explicar porque generalmente se asocia a CM de GH mayor, tipo TN. No tenemos explicación de la asociación con la obesidad, pero esto puede ser objeto de estudio en muestras más amplias para poder establecer su verdadero significado.

En el estudio de Miyoshi y cols. (2019), en el que se incluyen pacientes RE positivos y HER2 negativos, se objetiva una asociación entre la cuantificación de TILs y la afectación ganglionar. Nuestros resultados coinciden con los de otros autores, que tampoco encontraron ninguna relación entre dichos parámetros (219) (226).

En el estudio de Gasparini (72), la expresión de la proteína p53 es un factor de peor pronóstico en las pacientes con ganglios negativos. En nuestro estudio no encontramos relación con el estado ganglionar, ni con el valor de TILs.

Tampoco encontramos asociación entre la expresión de Bcl2 y la afectación ganglionar, aunque en algunos estudios se describe una relación con la afectación axilar como un factor de buen pronóstico (75).

En resumen, los resultados de este estudio en el CM precoz indican que, tanto algunos parámetros clínicos (edad de menarquia temprana, hábito alcohólico) como parámetros radiológicos (multifocalidad, imagen de distorsión, mayor tamaño en la resonancia magnética) se relacionan con un mayor riesgo de afectación del GC. Sin

embargo, ni el resto de los parámetros clínicos, ni los parámetros patológicos estudiados (GH, RE, RP, sobreexpresión de HER2, ILV y la invasión perineural), ni la cuantificación de los TILs, según los criterios de Salgado, nos permiten predecir el estado del GC.

El objetivo fundamental de nuestro trabajo fue analizar el papel de los TILs como factor predictivo de la afectación de los GNC, en los casos de GC positivo mediante técnica OSNA (7). Para ello establecimos dos grupos de pacientes con GC positivo, uno con afectación de GNC y otro sin afectación de GNC. El estudio del GC en el Hospital Universitario Central de Asturias se realiza desde abril de 2014 mediante el método molecular OSNA. Desde entonces, el valor que se considera como punto de corte para la realización de la LA en el análisis del GC por técnica OSNA, ha cambiado. En el periodo del estudio, se realizó la LA siempre que la carga tumoral fue  $>5.000$  copias de ARNm de CK19.

En los primeros estudios publicados, el resultado molecular cuantitativo se relacionó con el tamaño histológico de las metástasis y se estableció un punto de corte de 5.000 copias de ARNm de CK 19 para diferenciar entre macrometástasis y micrometástasis (7). Este punto de corte establecía el criterio para la realización de la LA, pero hasta en un 40-70% de las LA no había ningún otro ganglio afectado y en un 25% se encontraban 4 o más ganglios afectados. Estos resultados sugerían que dicho punto de corte determinaba un sobrediagnóstico de micrometástasis y de macrometástasis.

En el año 2013, Peg y cols. definen el concepto de CTT como la suma de las copias de ARNm de CK19 de todos los GC positivos aislados, parámetro predictor independiente de GNC positivos y establecen un punto de corte  $>15.000$  copias como el valor a partir del cual se indica realizar la LA, con una sensibilidad del 76,7% y una especificidad del 55,2% (227). A partir de este momento se publican varios estudios en los que establecen distintas CTT como puntos de corte predictivos de la afectación de los GNC con sensibilidad y especificidad variables pero por encima del 70% (228)((229)((230)(231). Espinosa -Bravo y cols. establecen un punto de corte de  $CTT > 1,2 \times 10^5$  con una especificidad del 86% y un valor predictivo negativo del 83% (228). Nabais y cols. establecen un punto de corte de la  $CTT > 1,9 \times 10^5$  con una

sensibilidad del 73% y una especificidad del 74% (229). Ohi y cols. fijan un punto de corte de la  $CTT > 1,0 \times 10^5$  como factor predictivo de afectación  $\geq 4$  GNC (230). Laohawiriyakamol y cols. establecen que con un punto de corte de la  $CTT > 1,9 \times 10^4$  con una sensibilidad del 72,7% y una especificidad del 84,7% (231).

En nuestro estudio, el punto de corte que predice la afectación de GNC es una  $CTT > 44.424$  copias de ARNm de CK19, con un área bajo la curva de 0,534, una sensibilidad del 61% y una especificidad del 41%. La sensibilidad de nuestro estudio es baja, debido al tamaño reducido de la muestra con afectación metastásica de GNC, pero sí está en concordancia con los datos de los estudios anteriormente referidos, en donde la CTT que predice la afectación de GNC es mayor de 15.000 copias de ARNm de CK19. Todos estos resultados publicados confirman la necesidad de revisar el punto de corte a partir del cual esté indicada la realización de LA tras el análisis del GC.

En nuestra serie, en un 27 % de los casos hubo afectación de GNC aplicando el punto de corte aceptado para el GC de 5.000 copias (7). Este resultado es similar al obtenido por Meretoja y cols. (205). Si al analizar el GC hubiésemos aplicado nuestro punto de corte de  $CTT > 44.000$  copias como predictivo de la afectación de GNC, no se hubiera realizado LA en 19 casos (44%). De estos, en 12 casos (28%) no hubo afectación de ningún GNC y de los 7 casos restantes, sólo en uno hubo más de tres GNC afectados.

No hay ninguna duda de que la determinación de la afectación del GC por el método OSNA tiene un resultado reproducible, independiente del patólogo y del Hospital donde se realice. Lo que sí pone de manifiesto toda la bibliografía revisada es que la CTT, que se considera como predictiva de afectación de GNC y es indicación de tratamiento axilar, debe ser modificada.

Por todo lo expuesto anteriormente, parece lógico pensar que es necesaria una revisión del punto de corte de la CTT del GC analizado por OSNA, incluso analizar si este valor asociado con otros parámetros nos permitiría evitar un porcentaje importante de tratamientos locales a nivel axilar. Peg y cols. ajustaron el valor de la CTT en relación con el tamaño tumoral, estado de HER2 y la ILV (227). Nosotros valoramos si

la cuantificación de TILs y la CTT podrían predecir con mayor precisión la afectación de GNC, pero no encontramos ninguna relación estadísticamente significativa.

El tamaño radiológico del tumor se tiene en cuenta en pocos estudios y, en la mayor parte, hacen referencia al tamaño patológico y su relación con la afectación de GNC. Nosotros encontramos que un tamaño radiológico mayor se asocia a un valor de TILs más alto y a un riesgo mayor de afectación de GNC, pero sin ser estadísticamente significativo.

Ninguna de las variables que se asociaron con la afectación del GC (edad de menarquia, hábito alcohólico, tamaño de tumor en RM, imagen de distorsión y multifocalidad) demostró tener valor predictivo del estado de los GNC. Es más, ninguno de los parámetros clínicos, radiológicos ni patológicos estudiados demostró relación con la afectación de los GNC.

Tampoco la cuantificación de los TILs estudiada en las BAG, a la que no se hace referencia en ninguno de los nomogramas conocidos, se asoció a la afectación de los GNC.

Tal y como se describe en los estudios anteriormente citados, la CTT sí tuvo en nuestro análisis un papel predictivo de la afectación de los GNC, pero no hubo ninguna relación entre la CTT y los TILs.

Nuestro trabajo es un estudio de un único centro hospitalario que aporta una descripción de la población de pacientes con CM precoz en nuestra área sanitaria, en la que el número de pacientes con GNC afectado es limitado, lo que impide alcanzar la significación estadística de las variables estudiadas relacionadas con la presencia de metástasis axilares.

La media de seguimiento de nuestras pacientes es de 65 meses. Si bien es un periodo de seguimiento superior a los 5 años, el número de eventos desfavorables en relación con la progresión de la enfermedad es muy limitado, con recaídas en únicamente tres pacientes y fallecimiento en un caso, lo cual se ajusta a lo esperado, ya que las pacientes incluidas en nuestro estudio presentan CM en estadio precoz, la mayor

parte RE positivos y HER2 negativos, que son los tumores con mejor pronóstico, con una supervivencia a los 5 años superior al 85%.

Seguimos sin identificar factores predictivos del estado de los GNC con una precisión suficiente para cambiar la práctica clínica, aunque la CTT parece un parámetro prometedor en ese aspecto. Creemos que debe ser revisado el punto de corte y buscar su posible relación con otros factores que conozcamos preoperatoriamente. El estudio de los TILs en tumores de mama más inmunogénicos (TN y HER2) ha demostrado su valor pronóstico. En tumores menos inmunogénicos (tumores Luminales), con niveles más bajos de TILs, se podría plantear un estudio más específico de los distintos tipos de células de este infiltrado.



# 7

## Conclusiones

---

### **Principal**

El análisis del infiltrado linfocitario tumoral (TILs) en el cáncer de mama precoz no ha demostrado su valor como factor predictivo del estado ganglionar. No se relaciona con la afectación del ganglio centinela ni con el estado ganglionar tras linfadenectomía axilar en los casos de ganglio centinela positivo.

### **Secundarias**

- 1ª. En el cáncer de mama precoz, el infiltrado linfocitario tumoral (TILs) no se asocia con ninguno de los factores pronósticos ni predictivos histopatológicos clásicos estudiados.
- 2º. Se demuestra que el análisis del ganglio centinela mediante la técnica OSNA es fiable y reproducible y que la carga tumoral total puede predecir la afectación axilar. El valor del infiltrado linfocitario tumoral no se relaciona con la carga tumoral del ganglio centinela en el cáncer de mama precoz.
- 3º. La cuantificación del infiltrado linfocitario tumoral (TILs) en la biopsia percutánea es extrapolable a la pieza quirúrgica. Por tanto, su cuantificación previa al tratamiento (quirúrgico o neoadyuvante) tendría valor en los tumores Triple Negativo y HER2 positivo.
- 4º. Se comprueba que los tumores de mama en estadio precoz con fenotipo Luminal difieren de los subtipos Triple Negativo y HER2 positivo en su respuesta inmunogénica.

- 5°. En el cáncer de mama, hallazgos radiológicos como la multifocalidad, el tamaño tumoral y el tipo de imagen radiológica son importantes para conocer, antes de la cirugía, las pacientes con mayor riesgo de afectación del ganglio centinela.

# 8

## Anexos

---

### 8.1. AUTORIZACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA

GOBIERNO DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS	Comité de Ética de la Investigación del Principado de Asturias
CONSEJERÍA DE SALUD	Hospital Universitario Central de Asturias
Dirección General de Calidad, Transformación y Gestión del Conocimiento	N-1, S3.19 Avda. de Roma, s/n 33011 Oviedo

Oviedo a jueves, 14 de abril de 2020

El Comité de Ética de la Investigación con Medicamentos del Principado de Asturias ha evaluado el Proyecto nº 2020.167, titulado: "Estudio del infiltrado inflamatorio intratumoral en el cáncer de mama y su relación con el estado ganglionar", Investigadora Principal, Dra. M<sup>a</sup> ANA LLANEZA FOLGUERAS, Hospital Universitario Central de Asturias.

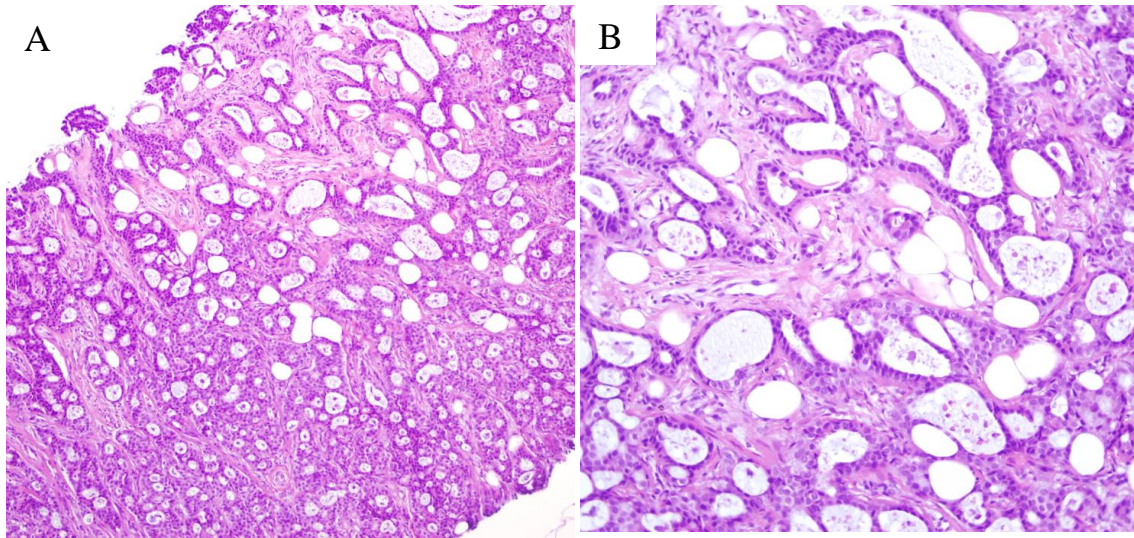
El Comité ha tomado el acuerdo de considerar que el citado Ensayo reúne las condiciones éticas necesarias para poder realizarse y, en consecuencia, emite su autorización.

Le recuerdo que deberá guardar la máxima confidencialidad de los datos utilizados en este Proyecto; les aconsejamos que el Consentimiento Informado se firme por duplicado y que el Investigador guarde una copia en el archivo.

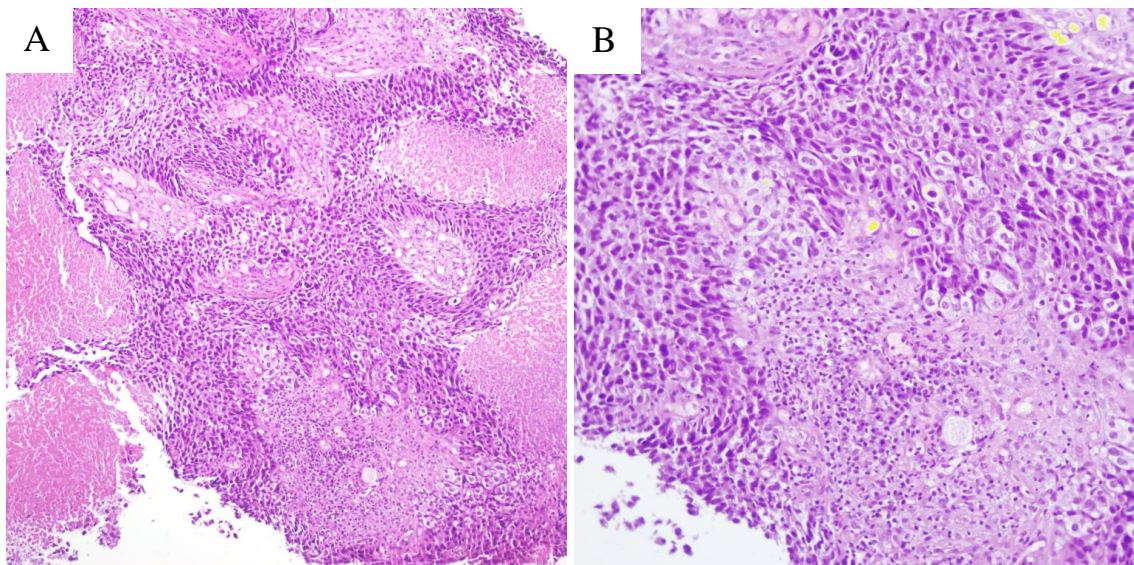
Le saluda atentamente.

Fdo: MAURICIO TELENTI ASENSIO  
Secretario/a del Comité de Ética de la Investigación  
del Principado de Asturias

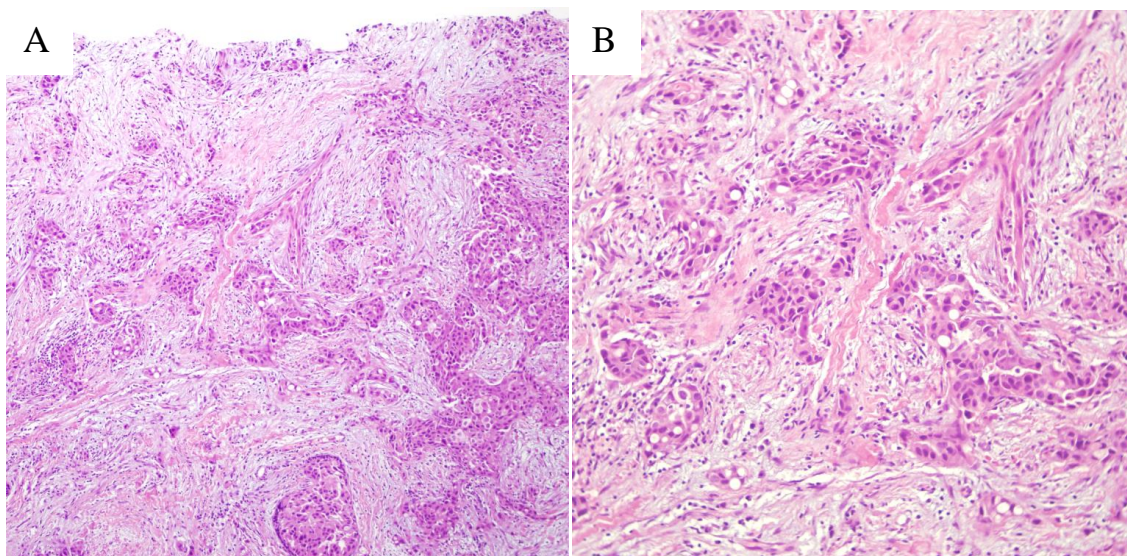
## 8.2. MICROFOTOGRAFÍAS



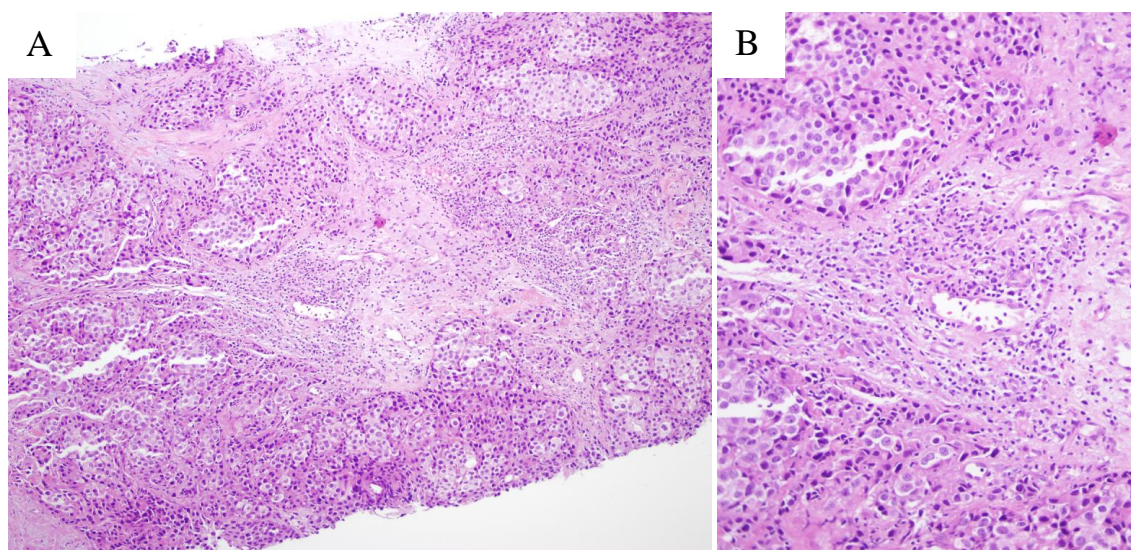
**Figura 15.** Ejemplo de CM GH 1 con pocos TILs (A. HE 100x; B. HE 200x).



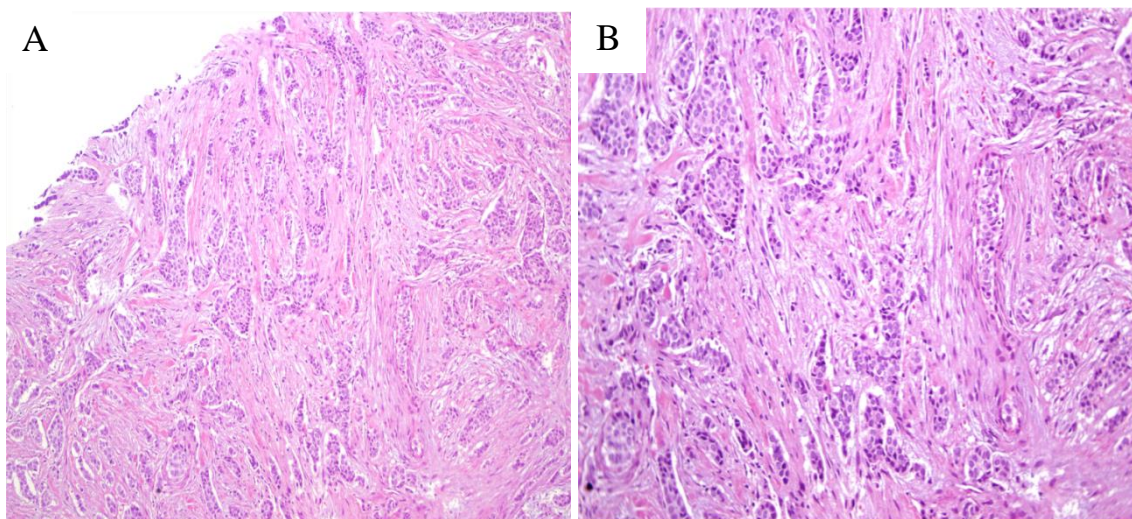
**Figura 16.** Ejemplo de CM GH 3 con necrosis extensa y TILs abundantes (A. HE 100x; B. HE 200x).



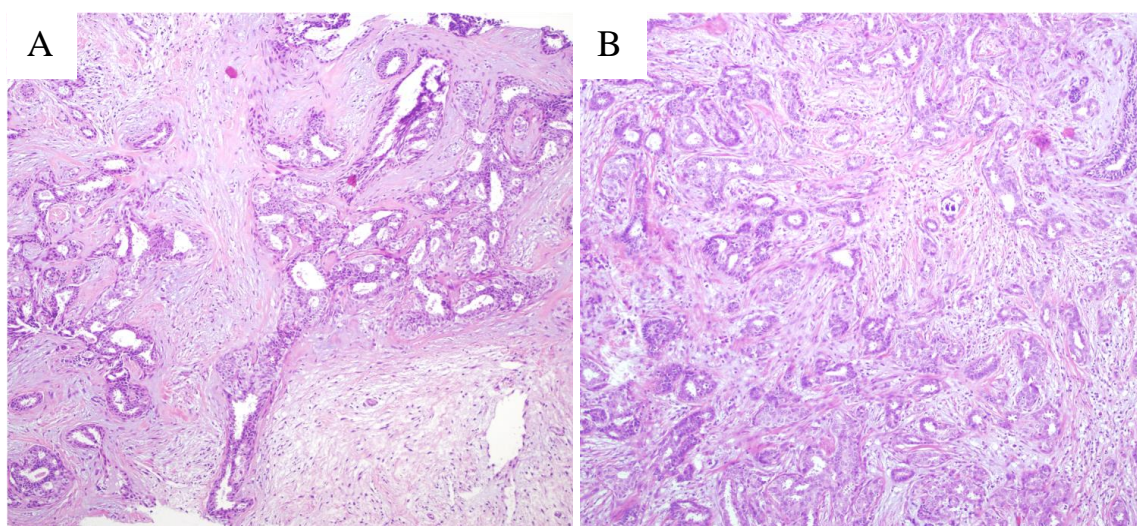
**Figura 17.** Ejemplo de CM con estroma abundante y TILs dispersos (A. HE 100x; B. HE 200x).



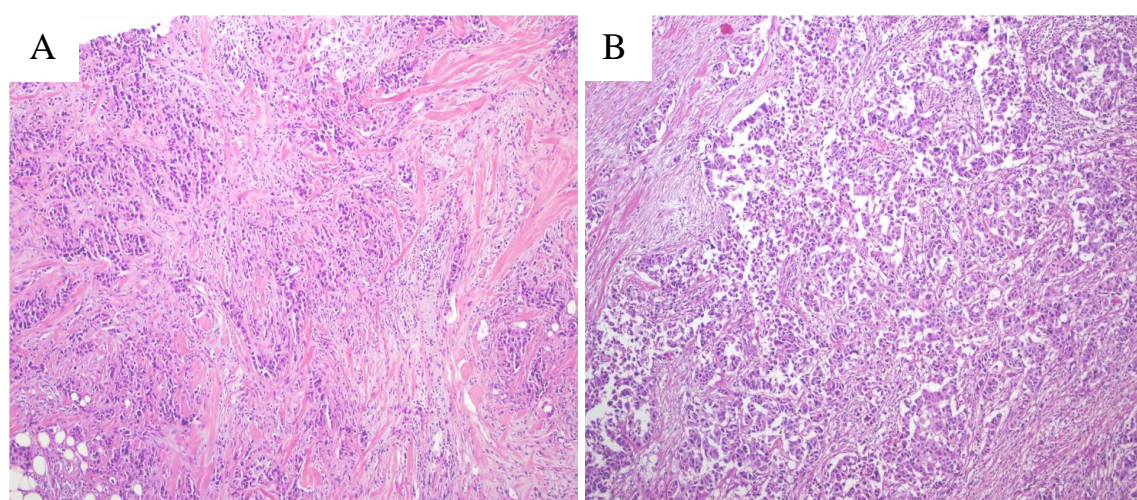
**Figura 18.** Ejemplo de CM con TILs abundantes más agrupados en el estroma (A. HE 100x; B. HE 200x).



**Figura 19.** Ejemplo de CM con pocos TILs en estroma abundante (A. HE 100x; B. HE 200x).



**Figura 20.** Ejemplo de CM con TILs en BAG (A) y pieza quirúrgica (B) misma paciente (HE 100x).



**Figura 21.** Ejemplo de CM con TILs en BAG (A) y pieza quirúrgica (B) misma paciente (HE 100x).



### 8.3. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.

#### Tablas

<b>Tabla 1:</b> Clasificación radiológica de imagen de mama del Colegio Americano de Radiología (BIRADS).....	25
<b>Tabla 2:</b> Resumen clasificación TNM.....	27
<b>Tabla 3:</b> Grado Histológico de Nottingham en CM. ....	31
<b>Tabla 4:</b> Clasificación molecular/clínico-patológica subrogada .....	39
<b>Tabla 5:</b> Criterios de inclusión y exclusión para la realización de la BSGC.....	56
<b>Tabla 6:</b> Inmunohistoquímica en BAG. Anticuerpos primarios.....	79
<b>Tabla 7:</b> Características clínicas de los pacientes.....	93
<b>Tabla 8:</b> Características histológicas de los CM (BAG) .....	94
<b>Tabla 9:</b> Características inmunohistoquímicas de los CM (BAG).....	95
<b>Tabla 10:</b> Correlación de TILs con características clínicas.....	101
<b>Tabla 11:</b> Correlación TILs con características radiológicas .....	102
<b>Tabla 12:</b> Correlación TILs con características histológicas de las BAG.....	102
<b>Tabla 13:</b> Correlación TILs y GH de las BAG.....	103
<b>Tabla 14:</b> Correlación TILs y parámetros inmunohistoquímicos de la BAG.....	104
<b>Tabla 15:</b> Correlación TILs y tipos moleculares .....	105
<b>Tabla 16:</b> Variables clínicas y afectación del GC. ....	107
<b>Tabla 17:</b> Correlación características radiológicas y estado del GC .....	109
<b>Tabla 18:</b> Correlación variables anatomopatológicas y estado del GC.....	110
<b>Tabla 19:</b> Mitosis y estado del GC .....	111
<b>Tabla 20:</b> Variables clínicas y estado de GNC.....	115
<b>Tabla 21:</b> Variables radiológicas y estado de GNC.....	116
<b>Tabla 22:</b> Variables anatomopatológicas y estado de GNC. ....	117

## Figuras

<b>Figura 1:</b> Linfedema en extremidad superior izquierda. ....	51
<b>Figura 2:</b> Método estándar para la valoración de TILs en el CM .....	81
<b>Figura 3:</b> Guía para valorar el porcentaje de TILs estromales en el CM .....	82
<b>Figura 4:</b> Linfogammagrafía preoperatoria. ....	83
<b>Figura 5:</b> Imagen tomográfica con SPECT-TC para localización de GC. ....	84
<b>Figura 6:</b> sonda portátil gammadectora y localización de GC en el quirófano. ....	85
<b>Figura 7:</b> Sala y equipo RD-100i Sysmex. Disección y peso del GC. ....	87
<b>Figura 8:</b> Homogenizado del GC (sobrenadante). Equipo análisis del GC. ....	88
<b>Figura 9:</b> Ejemplo interpretación de los resultados de las copias ARNm de CK19. ....	88
<b>Figura 10:</b> Distribución CM según fenotipo molecular. ....	96
<b>Figura 11:</b> GH en BAG y Pieza de exéresis quirúrgica. ....	97
<b>Figura 12:</b> Distribución de TILs en BAG y en Pieza de exéresis quirúrgica. ....	98
<b>Figura 13:</b> Distribución de TILs en BAG y en Pieza de exéresis quirúrgica. ....	99
<b>Figura 14:</b> Tamaño tumoral según Mamografía, RM y en Pieza de exéresis quirúrgica. ....	100
<b>Figura 22:</b> Fenotipo molecular y estado del GC. ....	111
<b>Figura 23:</b> TILs y estado del GC. ....	112
<b>Figura 24:</b> Tratamiento quirúrgico de la mama y estado del GC. ....	113
<b>Figura 25:</b> Linfedema y estado del GC. ....	114
<b>Figura 26:</b> Afectación de GNC en la LA. ....	115
<b>Figura 27:</b> CCT de los GC en los casos de LA. ....	118
<b>Figura 28:</b> Curva de ROC de la CCT. ....	119
<b>Figura 29:</b> Fenotipo molecular y estado de GNC. ....	119
<b>Figura 30:</b> TILs y estado de GNC. ....	120
<b>Figura 31:</b> Supervivencia libre de enfermedad. ....	121
<b>Figura 32:</b> Supervivencia global. ....	122
<b>Figura 15:</b> Ejemplo de CM GH 1 con pocos TILs. ....	145

---

<b>Figura 16.</b> Ejemplo de CM GH 3 con necrosis extensa y TILs abundantes.....	145
<b>Figura 17.</b> Ejemplo de CM con estroma abundante y TILs dispersos .....	146
<b>Figura 18.</b> Ejemplo de CM con TILs abundantes más agrupados en el estroma .....	146
<b>Figura 19.</b> Ejemplo de CM con pocos TILs en estroma abundante .....	147
<b>Figura 20.</b> Ejemplo de CM con TILs en BAG (A) y pieza quirúrgica (B) misma paciente .....	147
<b>Figura 21.</b> Ejemplo de CM con TILs en BAG (A) y pieza quirúrgica (B) misma paciente .....	147

# 9

## Bibliografía

---

## 9. BIBLIOGRAFÍA

---

1. Halsted WS. I. The Results of Operations for the Cure of Cancer of the Breast Performed at the Johns Hopkins Hospital from June, 1889, to January, 1894. *Ann Surg.* 1894 Nov;20(5):497–555.
2. Veronesi U, Saccozzi R, Del Vecchio M, Banfi A, Clemente C, De Lena M, et al. Comparing Radical Mastectomy with Quadrantectomy, Axillary Dissection, and Radiotherapy in Patients with Small Cancers of the Breast. *N Engl J Med.* 1981 Jul 2;305(1):6–11.
3. Fisher B, Redmond C, Poisson R, Margolese R, Wolmark N, Wickerham L, et al. Eight-Year Results of a Randomized Clinical Trial Comparing Total Mastectomy and Lumpectomy with or without Irradiation in the Treatment of Breast Cancer. *N Engl J Med.* 1989 Mar 30;320(13):822–8.
4. Fisher B, Bauer M, Wickerham DL, Redmond CK, Fisher ER, Cruz AB, et al. Relation of number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. An NSABP update. *Cancer.* 1983 Nov 1;52(9):1551–7.
5. Soares EWS, Nagai HM, Bredt LC, da Cunha AD, Andrade RJ, Soares GVS. Morbidity after conventional dissection of axillary lymph nodes in breast cancer patients. *World J Surg Oncol.* 2014 Mar 27;12:67.
6. Changsri C, Prakash S, Sandweiss L, Bose S. Prediction of Additional Axillary Metastasis of Breast Cancer Following Sentinel Lymph Node Surgery. *Breast J.* 2004;10(5):392–7.
7. Tsujimoto M, Nakabayashi K, Yoshidome K, Kaneko T, Iwase T, Akiyama F, et al. One-step Nucleic Acid Amplification for Intraoperative Detection of Lymph Node Metastasis in Breast Cancer Patients. *Clin Cancer Res.* 2007 Aug 15;13(16):4807–16.

8. Wein L, Savas P, Luen SJ, Virassamy B, Salgado R, Loi S. Clinical Validity and Utility of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Routine Clinical Practice for Breast Cancer Patients: Current and Future Directions. *Front Oncol* [Internet]. 2017 Aug 3 [cited 2020 Feb 25];7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5540942/>
9. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin*. 2022;72(1):7–33.
10. Rojas K, Stuckey A. Breast Cancer Epidemiology and Risk Factors. *Clin Obstet Gynecol*. 2016;59(4):651–72.
11. Miller KD, Goding Sauer A, Ortiz AP, Fedewa SA, Pinheiro PS, Tortolero-Luna G, et al. Cancer Statistics for Hispanics/Latinos, 2018. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):425–45.
12. Yoshida R. Hereditary breast and ovarian cancer (HBOC): review of its molecular characteristics, screening, treatment, and prognosis. *Breast Cancer Tokyo Jpn*. 2021;28(6):1167–80.
13. Breast Cancer Risk Genes — Association Analysis in More than 113,000 Women. *N Engl J Med*. 2021 Feb 4;384(5):428–39.
14. Bucchi L, Belli P, Benelli E, Bernardi D, Brancato B, Calabrese M, et al. Recommendations for breast imaging follow-up of women with a previous history of breast cancer: position paper from the Italian Group for Mammography Screening (GISMa) and the Italian College of Breast Radiologists (ICBR) by SIRM. *Radiol Med (Torino)*. 2016;121(12):891–6.
15. Salamat F, Niakan B, Keshtkar A, Rafiei E, Zendehtdel M. Subtypes of Benign Breast Disease as a Risk Factor of Breast Cancer: A Systematic Review and Meta Analyses. *Iran J Med Sci*. 2018 Jul;43(4):355–64.

16. Visscher DW, Frank RD, Carter JM, Vierkant RA, Winham SJ, Heinzen EP, et al. Breast Cancer Risk and Progressive Histology in Serial Benign Biopsies. *JNCI J Natl Cancer Inst* [Internet]. 2017 Mar 17 [cited 2019 Nov 21];109(10). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5412118/>
17. Edwards BL, Atkins KA, Stukenborg GJ, Novicoff WM, Larson KN, Cohn WF, et al. The Association of Mammographic Density and Molecular Breast Cancer Subtype. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. 2017;26(10):1487–92.
18. Anderson KN, Schwab RB, Martinez ME. Reproductive risk factors and breast cancer subtypes: a review of the literature. *Breast Cancer Res Treat*. 2014 Feb;144(1):1–10.
19. Redondo CM, Gago-Domínguez M, Ponte SM, Castelo ME, Jiang X, García AA, et al. Breast Feeding, Parity and Breast Cancer Subtypes in a Spanish Cohort. *PLoS ONE*. 2012 Jul 11;7(7):e40543.
20. Westhoff CL, Pike MC. Hormonal contraception and breast cancer. *Am J Obstet Gynecol*. 2018 Aug;219(2):169.e1-169.e4.
21. Mørch LS, Skovlund CW, Hannaford PC, Iversen L, Fielding S, Lidegaard Ø. Contemporary Hormonal Contraception and the Risk of Breast Cancer [Internet]. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1700732>. 2017 [cited 2019 Nov 17]. Available from: [https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1700732?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3Dwww.ncbi.nlm.nih.gov](https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1700732?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dwww.ncbi.nlm.nih.gov)
22. Hodis HN, Bauer HJ, Rawlins DB, Sarrel PM. Menopausal Hormone Therapy and Breast Cancer: What is the Evidence from Randomized Trials? *Climacteric J Int Menopause Soc*. 2018 Dec;21(6):521–8.
23. Picon-Ruiz M, Morata-Tarifa C, Valle-Goffin JJ, Friedman ER, Slingerland JM. Obesity and adverse breast cancer risk and outcome: Mechanistic insights and strategies for intervention. *Ca*. 2017;67(5):378–97.

24. Drooger JC, Hooning MJ, Seynaeve CM, Baaijens MHA, Obdeijn IM, Sleijfer S, et al. Diagnostic and therapeutic ionizing radiation and the risk of a first and second primary breast cancer, with special attention for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: a critical review of the literature. *Cancer Treat Rev.* 2015 Feb;41(2):187–96.
25. Liu Y, Nguyen N, Colditz GA. Links between alcohol consumption and breast cancer: a look at the evidence. *Womens Health Lond Engl.* 2015 Jan;11(1):65–77.
26. Freudenheim JL. Alcohol's Effects on Breast Cancer in Women. *Alcohol Res Curr Rev.* 2020 Jun 18;40(2):11.
27. Goldvaser H, Gal O, Rizel S, Hendler D, Neiman V, Shochat T, et al. The association between smoking and breast cancer characteristics and outcome. *BMC Cancer* [Internet]. 2017 Sep 6 [cited 2019 Nov 21];17. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5585941/>
28. Jones ME, Schoemaker MJ, Wright LB, Ashworth A, Swerdlow AJ. Smoking and risk of breast cancer in the Generations Study cohort. *Breast Cancer Res BCR* [Internet]. 2017 [cited 2019 Nov 17];19. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5698948/>
29. Mourouti N, Kontogianni MD, Papavagelis C, Panagiotakos DB. Diet and breast cancer: a systematic review. *Int J Food Sci Nutr.* 2015 Feb;66(1):1–42.
30. Engel CL, Sharima Rasanayagam M, Gray JM, Rizzo J. Work and Female Breast Cancer: The State of the Evidence, 2002–2017. *NEW Solut J Environ Occup Health Policy.* 2018 May 1;28(1):55–78.
31. Eberl MM, Fox CH, Edge SB, Carter CA, Mahoney MC. BI-RADS Classification for Management of Abnormal Mammograms. *J Am Board Fam Med.* 2006 Mar 1;19(2):161–4.
32. Spak DA, Plaxco JS, Santiago L, Dryden MJ, Dogan BE. BI-RADS® fifth edition: A summary of changes. *Diagn Interv Imaging.* 2017 Mar 1;98(3):179–90.



33. Chong A, Weinstein SP, McDonald ES, Conant EF. Digital Breast Tomosynthesis: Concepts and Clinical Practice. *Radiology*. 2019 Jul;292(1):1–14.
34. Cools-Lartigue J, Meterissian S. Accuracy of Axillary Ultrasound in the Diagnosis of Nodal Metastasis in Invasive Breast Cancer: A Review. *World J Surg*. 2012 Jan 1;36(1):46–54.
35. Bedi DG, Krishnamurthy R, Krishnamurthy S, Edeiken BS, Le-Petross H, Fornage BD, et al. Cortical Morphologic Features of Axillary Lymph Nodes as a Predictor of Metastasis in Breast Cancer: In Vitro Sonographic Study. *Am J Roentgenol*. 2008 Sep 1;191(3):646–52.
36. Medeiros LR, Duarte CS, Rosa DD, Edelweiss MI, Edelweiss M, Silva FR, et al. Accuracy of magnetic resonance in suspicious breast lesions: a systematic quantitative review and meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*. 2011 Apr;126(2):273–85.
37. Mann RM, Balleyguier C, Baltzer PA, Bick U, Colin C, Cornford E, et al. Breast MRI: EUSOBI recommendations for women’s information. *Eur Radiol*. 2015;25(12):3669–78.
38. Tan PH, Ellis I, Allison K, Brogi E, Fox SB, Lakhani S, et al. The 2019 World Health Organization classification of tumours of the breast. *Histopathology*. 2020;77(2):181–5.
39. Perou CM, Sørli T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000 Aug;406(6797):747–52.
40. Weiss A, Chavez-MacGregor M, Lichtensztajn DY, Yi M, Tadros A, Hortobagyi GN, et al. Validation Study of the American Joint Committee on Cancer Eighth Edition Prognostic Stage Compared With the Anatomic Stage in Breast Cancer. *JAMA Oncol*. 2018 Feb;4(2):203–9.
41. Giuliano AE, Edge SB, Hortobagyi GN. Eighth Edition of the AJCC Cancer Staging Manual: Breast Cancer. *Ann Surg Oncol*. 2018 Jul 1;25(7):1783–5.

42. Almagro E, González CS, Espinosa E. [Prognostic factors of early breast cancer]. *Med Clin (Barc)*. 2016 Feb 19;146(4):167–71.
43. Chen H long, Zhou M qi, Tian W, Meng K xin, He H fei. Effect of Age on Breast Cancer Patient Prognoses: A Population-Based Study Using the SEER 18 Database. *PLoS ONE* [Internet]. 2016 Oct 31 [cited 2019 Nov 18];11(10). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5087840/>
44. Warner ET, Tamimi RM, Hughes ME, Ottesen RA, Wong YN, Edge SB, et al. Racial and Ethnic Differences in Breast Cancer Survival: Mediating Effect of Tumor Characteristics and Sociodemographic and Treatment Factors. *J Clin Oncol*. 2015 Jul 10;33(20):2254–61.
45. Banerjee M, George J, Song EY, Roy A, Hryniuk W. Tree-Based Model for Breast Cancer Prognostication. *J Clin Oncol*. 2004 Jul 1;22(13):2567–75.
46. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer*. 1989 Jan 1;63(1):181–7.
47. Foulkes WD, Reis-Filho JS, Narod SA. Tumor size and survival in breast cancer--a reappraisal. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010 Jun;7(6):348–53.
48. Cserni G. Histological type and typing of breast carcinomas and the WHO classification changes over time. *Pathologica*. 2020 Mar;112(1):25–41.
49. Schwartz AM, Henson DE, Chen D, Rajamarthandan S. Histologic Grade Remains a Prognostic Factor for Breast Cancer Regardless of the Number of Positive Lymph Nodes and Tumor Size: A Study of 161 708 Cases of Breast Cancer From the SEER Program. *Arch Pathol Lab Med*. 2014 Jul 30;138(8):1048–52.
50. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991 Nov;19(5):403–10.

51. Bloom HJ, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer*. 1957 Sep;11(3):359–77.
52. van Dooijeweert C, Baas IO, Deckers IAG, Siesling S, van Diest PJ, van der Wall E. The increasing importance of histologic grading in tailoring adjuvant systemic therapy in 30,843 breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2021;187(2):577–86.
53. Rakha EA, Martin S, Lee AHS, Morgan D, Pharoah PDP, Hodi Z, et al. The prognostic significance of lymphovascular invasion in invasive breast carcinoma. *Cancer*. 2012;118(15):3670–80.
54. Hammond MEH, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer (Unabridged Version). *Arch Pathol Lab Med*. 2010 Jul 1;134(7):e48–72.
55. Prat A, Cheang MCU, Martín M, Parker JS, Carrasco E, Caballero R, et al. Prognostic Significance of Progesterone Receptor–Positive Tumor Cells Within Immunohistochemically Defined Luminal A Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 2013 Jan 10;31(2):203–9.
56. Kono M, Fujii T, Lim B, Karuturi MS, Tripathy D, Ueno NT. Androgen Receptor Function and Androgen Receptor-Targeted Therapies in Breast Cancer: A Review. *JAMA Oncol*. 2017 Sep 1;3(9):1266–73.
57. Héquet D, Mzoughi S, Rouzier R, Guccione E. [Androgen receptors in breast cancer: Expression, value and therapeutic prospects]. *Bull Cancer (Paris)*. 2017 Apr;104(4):363–9.
58. Bhattarai S, Klimov S, Mittal K, Krishnamurti U, Li X (Bill), Oprea-Ilies G, et al. Prognostic Role of Androgen Receptor in Triple Negative Breast Cancer: A Multi-Institutional Study. *Cancers*. 2019 Jul 17;11(7):995.

59. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene | Science [Internet]. [cited 2019 Nov 23]. Available from: <https://science.sciencemag.org/content/235/4785/177.long>
60. Pernas S, Barroso-Sousa R, Tolaney SM. Optimal treatment of early stage HER2-positive breast cancer. *Cancer*. 2018;124(23):4455–66.
61. Wolff AC, Hammond MEH, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, et al. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol*. 2013 Oct 7;31(31):3997–4013.
62. An international study to increase concordance in Ki67 scoring | Modern Pathology [Internet]. [cited 2019 Nov 24]. Available from: <https://www.nature.com/articles/modpathol201538>
63. Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, Bartlett J, Coombes RC, Cuzick J, et al. Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer Working Group. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2011 Nov 16;103(22):1656–64.
64. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol*. 2013 Sep;24(9):2206–23.
65. Petrelli F, Viale G, Cabiddu M, Barni S. Prognostic value of different cut-off levels of Ki-67 in breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 64,196 patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2015 Oct 1;153(3):477–91.
66. Pooled Analysis of the Prognostic Relevance of Circulating Tumor Cells in Primary Breast Cancer | Clinical Cancer Research [Internet]. [cited 2019 Nov 24]. Available from: <https://clincancerres.aacrjournals.org/content/22/10/2583.long>

67. Garcia-Murillas I, Schiavon G, Weigelt B, Ng C, Hrebien S, Cutts RJ, et al. Mutation tracking in circulating tumor DNA predicts relapse in early breast cancer. *Sci Transl Med*. 2015 Aug 26;7(302):302ra133-302ra133.
68. Pereira B, Chin SF, Rueda OM, Vollan HKM, Provenzano E, Bardwell HA, et al. The somatic mutation profiles of 2,433 breast cancers refines their genomic and transcriptomic landscapes. *Nat Commun* [Internet]. 2016 May 10 [cited 2019 Dec 2];7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4866047/>
69. Dumay A, Feugeas JP, Wittmer E, Lehmann-Che J, Bertheau P, Espié M, et al. Distinct tumor protein p53 mutants in breast cancer subgroups. *Int J Cancer*. 2013 Mar 1;132(5):1227–31.
70. Li J ping, Zhang X mei, Zhang Z, Zheng L hua, Jindal S, Liu Y jiang. Association of p53 expression with poor prognosis in patients with triple-negative breast invasive ductal carcinoma. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 2019 May 3 [cited 2019 Dec 1];98(18). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6504250/>
71. Lee SK, Bae SY, Lee JH, Lee HC, Yi H, Kil WH, et al. Distinguishing Low-Risk Luminal A Breast Cancer Subtypes with Ki-67 and p53 Is More Predictive of Long-Term Survival. *PLoS ONE* [Internet]. 2015 Aug 4 [cited 2019 Nov 30];10(8). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4524613/>
72. Prognostic significance of p53, angiogenesis, and other conventional features in operable breast cancer: subanalysis in node-positive and node-negative patients. [Internet]. [cited 2019 Nov 29]. Available from: <https://www.spandidos-publications.com/ijo/12/5/1117>
73. Silvestrini R, Veneroni S, Daidone MG, Benini E, Boracchi P, Mezzetti M, et al. The Bcl-2 Protein: a Prognostic Indicator Strongly Related to p53 Protein in Lymph Node-Negative Breast Cancer Patients. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 1994 Apr 6;86(7):499–504.

74. Hwang KT, Kim K, Chang JH, Oh S, Kim YA, Lee JY, et al. BCL2 Regulation according to Molecular Subtype of Breast Cancer by Analysis of The Cancer Genome Atlas Database. *Cancer Res Treat Off J Korean Cancer Assoc.* 2018 Jul;50(3):658.
75. Ayadi EZ, Cherif B, Hamed YB, Yahia NB, Mokni M, Rebai A, et al. Prognostic Value of BCL2 in Women Patients with Invasive Breast Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP.* 2018;19(12):3557–64.
76. Adams S, Gray RJ, Demaria S, Goldstein L, Perez EA, Shulman LN, et al. Prognostic Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Triple-Negative Breast Cancers From Two Phase III Randomized Adjuvant Breast Cancer Trials: ECOG 2197 and ECOG 1199. *J Clin Oncol.* 2014 Sep 20;32(27):2959–66.
77. Loi S, Michiels S, Salgado R, Sirtaine N, Jose V, Fumagalli D, et al. Tumor infiltrating lymphocytes are prognostic in triple negative breast cancer and predictive for trastuzumab benefit in early breast cancer: results from the FinHER trial. *Ann Oncol.* 2014 Aug 1;25(8):1544–50.
78. Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruneri G, et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol.* 2015 Feb;26(2):259–71.
79. Sabatier R, Finetti P, Mamessier E, Adelaide J, Chaffanet M, Ali HR, et al. Prognostic and predictive value of PDL1 expression in breast cancer. *Oncotarget.* 2014 Dec 31;6(7):5449–64.
80. Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJM, Robert L, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature.* 2014 Nov 27;515(7528):568–71.
81. Sørliie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Sep 11;98(19):10869–74.

82. Cheang MCU, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, et al. Ki67 Index, HER2 Status, and Prognosis of Patients With Luminal B Breast Cancer. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 2009 May 20;101(10):736–50.
83. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, Ibrahim N, Cristofanilli M, Anderson K, et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2005 Aug 15;11(16):5678–85.
84. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of Chemotherapy plus a Monoclonal Antibody against HER2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER2. *N Engl J Med.* 2001 Mar 15;344(11):783–92.
85. Leidy J, Khan A, Kandil D. Basal-like breast cancer: update on clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular features. *Arch Pathol Lab Med.* 2014 Jan;138(1):37–43.
86. Foulkes WD, Brunet JS, Stefansson IM, Straume O, Chappuis PO, Bégin LR, et al. The Prognostic Implication of the Basal-Like (Cyclin Ehigh/p27low/p53+/Glomeruloid-Microvascular-Proliferation+) Phenotype of BRCA1-Related Breast Cancer. *Cancer Res.* 2004 Feb 1;64(3):830–5.
87. Ahn SG, Kim SJ, Kim C, Jeong J. Molecular Classification of Triple-Negative Breast Cancer. *J Breast Cancer.* 2016 Sep;19(3):223–30.
88. Sporikova Z, Koudelakova V, Trojanec R, Hajduch M. Genetic Markers in Triple-Negative Breast Cancer. *Clin Breast Cancer.* 2018 Oct 1;18(5):e841–50.
89. Tang P, Tse GM. Immunohistochemical Surrogates for Molecular Classification of Breast Carcinoma: A 2015 Update. *Arch Pathol Lab Med.* 2016 Jul 29;140(8):806–14.
90. Rouzier R, Pronzato P, Chéreau E, Carlson J, Hunt B, Valentine WJ. Multigene assays and molecular markers in breast cancer: systematic review of health economic analyses. *Breast Cancer Res Treat.* 2013 Jun;139(3):621–37.

91. Clinical utility of gene-expression signatures in early stage breast cancer | Nature Reviews Clinical Oncology [Internet]. [cited 2019 Nov 27]. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrclinonc.2017.74>
92. Sapino A, Roepman P, Linn SC, Snel MHJ, Delahaye LJMJ, van den Akker J, et al. MammaPrint molecular diagnostics on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *J Mol Diagn JMD*. 2014 Mar;16(2):190–7.
93. Buyse M, Loi S, van't Veer L, Viale G, Delorenzi M, Glas AM, et al. Validation and Clinical Utility of a 70-Gene Prognostic Signature for Women With Node-Negative Breast Cancer. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2006 Sep 6;98(17):1183–92.
94. Bueno-de-Mesquita JM, Linn SC, Keijzer R, Wesseling J, Nuyten DSA, van Krimpen C, et al. Validation of 70-gene prognosis signature in node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2009 Oct 1;117(3):483–95.
95. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AAM, Mao M, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002 Jan;415(6871):530–6.
96. Mook S, Schmidt MK, Viale G, Pruneri G, Eekhout I, Floore A, et al. The 70-gene prognosis-signature predicts disease outcome in breast cancer patients with 1–3 positive lymph nodes in an independent validation study. *Breast Cancer Res Treat*. 2009 Jul 1;116(2):295–302.
97. Knauer M, Cardoso F, Wesseling J, Bedard PL, Linn SC, Rutgers EJT, et al. Identification of a low-risk subgroup of HER-2-positive breast cancer by the 70-gene prognosis signature. *Br J Cancer*. 2010 Dec 7;103(12):1788–93.



98. Cardoso F, van't Veer LJ, Bogaerts J, Slaets L, Viale G, Delaloge S, et al. 70-Gene Signature as an Aid to Treatment Decisions in Early-Stage Breast Cancer [Internet]. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1602253>. 2016 [cited 2019 Nov 29]. Available from: [https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1602253?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3Dwww.ncbi.nlm.nih.gov](https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1602253?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dwww.ncbi.nlm.nih.gov)
99. Krop I, Ismaila N, Andre F, Bast RC, Barlow W, Collyar DE, et al. Use of Biomarkers to Guide Decisions on Adjuvant Systemic Therapy for Women With Early-Stage Invasive Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Focused Update. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2017 Aug 20;35(24):2838–47.
100. Oratz R, Paul D, Cohn AL, Sedlacek SM. Impact of a Commercial Reference Laboratory Test Recurrence Score on Decision Making in Early-Stage Breast Cancer. *J Oncol Pract*. 2007 Jul;3(4):182–6.
101. Habel LA, Shak S, Jacobs MK, Capra A, Alexander C, Pho M, et al. A population-based study of tumor gene expression and risk of breast cancer death among lymph node-negative patients. *Breast Cancer Res*. 2006;8(3):R25.
102. Sparano JA, Gray RJ, Makower DF, Pritchard KI, Albain KS, Hayes DF, et al. Prospective Validation of a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2015 Nov 19;373(21):2005–14.
103. Mamounas EP, Tang G, Fisher B, Paik S, Shak S, Costantino JP, et al. Association Between the 21-Gene Recurrence Score Assay and Risk of Locoregional Recurrence in Node-Negative, Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer: Results From NSABP B-14 and NSABP B-20. *J Clin Oncol*. 2010 Apr 1;28(10):1677–83.

104. Albain KS, Barlow WE, Shak S, Hortobagyi GN, Livingston RB, Yeh IT, et al. Prognostic and Predictive Value of the 21-Gene Recurrence Score Assay in a Randomized Trial of Chemotherapy for Postmenopausal, Node-Positive, Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer. *Lancet Oncol.* 2010 Jan;11(1):55–65.
105. Kronenwett R, Bohmann K, Prinzler J, Sinn BV, Haufe F, Roth C, et al. Decentral gene expression analysis: analytical validation of the Endopredict genomic multianalyte breast cancer prognosis test. *BMC Cancer.* 2012;12:456.
106. Denkert C, Kronenwett R, Schlake W, Bohmann K, Penzel R, Weber KE, et al. Decentral gene expression analysis for ER+/Her2– breast cancer: results of a proficiency testing program for the EndoPredict assay. *Virchows Arch.* 2012 Mar;460(3):251–9.
107. Martin M, Brase JC, Calvo L, Krappmann K, Ruiz-Borrego M, Fisch K, et al. Clinical validation of the EndoPredict test in node-positive, chemotherapy-treated ER+/HER2– breast cancer patients: results from the GEICAM 9906 trial. *Breast Cancer Res BCR.* 2014;16(2):R38.
108. Parker JS, Mullins M, Cheang MCU, Leung S, Voduc D, Vickery T, et al. Supervised Risk Predictor of Breast Cancer Based on Intrinsic Subtypes. *J Clin Oncol.* 2009 Mar 10;27(8):1160–7.
109. Gnant M, Filipits M, Greil R, Stoeger H, Rudas M, Bago-Horvath Z, et al. Predicting distant recurrence in receptor-positive breast cancer patients with limited clinicopathological risk: using the PAM50 Risk of Recurrence score in 1478 postmenopausal patients of the ABCSG-8 trial treated with adjuvant endocrine therapy alone. *Ann Oncol.* 2014 Feb 1;25(2):339–45.
110. Dowsett M, Sestak I, Lopez-Knowles E, Sidhu K, Dunbier AK, Cowens JW, et al. Comparison of PAM50 Risk of Recurrence Score With Oncotype DX and IHC4 for Predicting Risk of Distant Recurrence After Endocrine Therapy. *J Clin Oncol.* 2013 Jul 1;31(22):2783–90.

111. Martín M, González-Rivera M, Morales S, Haba-Rodriguez J de la, González-Cortijo L, Manso L, et al. Prospective study of the impact of the Prosigna assay on adjuvant clinical decision-making in unselected patients with estrogen receptor positive, human epidermal growth factor receptor negative, node negative early-stage breast cancer. *Curr Med Res Opin.* 2015 Jun 3;31(6):1129–37.
112. Comprehensive molecular portraits of human breast tumors. *Nature.* 2012 Oct 4;490(7418):61–70.
113. Ciriello G, Gatza ML, Beck AH, Wilkerson MD, Rhie SK, Pastore A, et al. Comprehensive molecular portraits of invasive lobular breast cancer. *Cell.* 2015 Oct 8;163(2):506–19.
114. Stephens PJ, Tarpey PS, Davies H, Van Loo P, Greenman C, Wedge DC, et al. The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. *Nature.* 2012 May 16;486(7403):400–4.
115. Rakha EA, El-Sayed ME, Lee AHS, Elston CW, Grainge MJ, Hodi Z, et al. Prognostic Significance of Nottingham Histologic Grade in Invasive Breast Carcinoma. *J Clin Oncol.* 2008 Jul 1;26(19):3153–8.
116. Olivotto IA, Bajdik CD, Ravdin PM, Speers CH, Coldman AJ, Norris BD, et al. Population-Based Validation of the Prognostic Model ADJUVANT! for Early Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 2005 Apr 20;23(12):2716–25.
117. pubmeddev, al VU et. Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2019 Dec 3]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12393819>
118. Castaneda SA, Strasser J. Updates in the Treatment of Breast Cancer with Radiotherapy. *Surg Oncol Clin N Am.* 2017;26(3):371–82.

119. Rosenberger LH, Mamtani A, Fuzesi S, Stempel M, Eaton A, Morrow M, et al. Early Adoption of the SSO-ASTRO Consensus Guidelines on Margins for Breast-Conserving Surgery with Whole-Breast Irradiation in Stage I and II Invasive Breast Cancer: Initial Experience from Memorial Sloan Kettering Cancer Center. *Ann Surg Oncol*. 2016 Oct;23(10):3239–46.
120. Acea-Nebril B, Cereijo-Garea C, García-Novoa A, Varela-Lamas C, Builes-Ramírez S, Bouzón-Alejandro A, et al. The role of oncoplastic breast reduction in the conservative management of breast cancer: Complications, survival, and quality of life. *J Surg Oncol*. 2017;115(6):679–86.
121. Peiris L, Olson D, Dabbs K. Oncoplastic and reconstructive breast surgery in Canada: breaking new ground in general surgical training. *Can J Surg*. 2018 Oct;61(5):294–9.
122. Plesca M, Bordea C, El Houcheimi B, Ichim E, Blidaru A. Evolution of radical mastectomy for breast cancer. *J Med Life*. 2016;9(2):183–6.
123. Galimberti V, Vicini E, Corso G, Morigi C, Fontana S, Sacchini V, et al. Nipple-sparing and skin-sparing mastectomy: review of aims, oncological safety and contraindications. *Breast Edinb Scotl*. 2017 Aug;34(Suppl 1):S82–4.
124. Weber WP, Haug M, Kurzeder C, Bjelic-Radisic V, Koller R, Reitsamer R, et al. Oncoplastic Breast Consortium consensus conference on nipple-sparing mastectomy. *Breast Cancer Res Treat*. 2018;172(3):523–37.
125. Ashikaga T, Krag DN, Land SR, Julian TB, Anderson SJ, Brown AM, et al. Morbidity Results from the NSABP B-32 Trial Comparing Sentinel Lymph Node Dissection versus Axillary Dissection. *J Surg Oncol*. 2010 Aug 1;102(2):111–8.
126. Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10 801 women in 17 randomised trials. *Lancet*. 2011 Nov 12;378(9804):1707–16.
127. Boyages J, Baker L. Evolution of radiotherapy techniques in breast conservation treatment. *Gland Surg*. 2018 Dec;7(6):576–95.

128. Livi L, Meattini I, Marrazzo L, Simontacchi G, Pallotta S, Saieva C, et al. Accelerated partial breast irradiation using intensity-modulated radiotherapy versus whole breast irradiation: 5-year survival analysis of a phase 3 randomised controlled trial. *Eur J Cancer*. 2015 Mar 1;51(4):451–63.
129. Long-term primary results of accelerated partial breast irradiation after breast-conserving surgery for early-stage breast cancer: a randomised, phase 3, equivalence trial - *The Lancet* [Internet]. [cited 2020 Feb 23]. Available from: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(19\)32514-0/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(19)32514-0/fulltext)
130. Rudra S, Roy A, Brenneman R, Gabani P, Roach MC, Ochoa L, et al. Radiation-Induced Brachial Plexopathy in Patients With Breast Cancer Treated With Comprehensive Adjuvant Radiation Therapy. *Adv Radiat Oncol*. 2021 Feb;6(1):100602.
131. Ruhstaller T, Giobbie-Hurder A, Colleoni M, Jensen MB, Ejlertsen B, de Azambuja E, et al. Adjuvant Letrozole and Tamoxifen Alone or Sequentially for Postmenopausal Women With Hormone Receptor–Positive Breast Cancer: Long-Term Follow-Up of the BIG 1-98 Trial. *J Clin Oncol*. 2019 Jan 10;37(2):105–14.
132. Fisusi FA, Akala EO. Drug Combinations in Breast Cancer Therapy. *Pharm Nanotechnol*. 2019;7(1):3–23.
133. Slamon D, Eiermann W, Robert N, Pienkowski T, Martin M, Press M, et al. Adjuvant Trastuzumab in HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2011 Oct 6;365(14):1273–83.
134. von Minckwitz G, Procter M, de Azambuja E, Zardavas D, Benyunes M, Viale G, et al. Adjuvant Pertuzumab and Trastuzumab in Early HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2017 Jul 13;377(2):122–31.

135. Kaufmann M, von Minckwitz G, Mamounas EP, Cameron D, Carey LA, Cristofanilli M, et al. Recommendations from an international consensus conference on the current status and future of neoadjuvant systemic therapy in primary breast cancer. *Ann Surg Oncol*. 2012 May;19(5):1508–16.
136. Gambardella C, Clarizia G, Patrone R, Offi C, Mauriello C, Romano R, et al. Advanced hemostasis in axillary lymph node dissection for locally advanced breast cancer: new technology devices compared in the prevention of seroma formation. *BMC Surg*. 2019 Apr 24;18(1):125.
137. Nguyen TT, Hoskin TL, Habermann EB, Cheville AL, Boughey JC. Breast Cancer Related Lymphedema risk is related to multidisciplinary treatment and not surgery alone – results from a large cohort study. *Ann Surg Oncol*. 2017 Oct;24(10):2972–80.
138. Pusic AL, Cemal Y, Albornoz C, Klassen A, Cano S, Sulimanoff I, et al. Quality of life among breast cancer patients with lymphedema: a systematic review of patient-reported outcome instruments and outcomes. *J Cancer Surviv Res Pract*. 2013 Mar;7(1):83–92.
139. Cornelissen AJM, Kool M, Keuter XHA, Heuts EM, Piatkowski de Grzymala AA, van der Hulst RRWJ, et al. Quality of Life Questionnaires in Breast Cancer-Related Lymphedema Patients: Review of the Literature. *Lymphat Res Biol*. 2018 Feb 13;16(2):134–9.
140. Penha TRL, Botter B, Heuts EM, Voogd AC, Meyenfeldt MF von, Hulst RR van der. Quality of Life in Patients with Breast Cancer–Related Lymphedema and Reconstructive Breast Surgery. *J Reconstr Microsurg*. 2016 Jul;32(6):484–90.
141. Taghian NR, Miller CL, Jammallo LS, O’Toole J, Skolny MN. Lymphedema following breast cancer treatment and impact on quality of life: A review. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2014 Dec 1;92(3):227–34.

142. Pereira de Godoy JM, Azoubel LMO, Guerreiro Godoy M de F. Erysipelas and lymphangitis in patients undergoing lymphedema treatment after breast-cancer therapy. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat.* 2009 Jun;18(2):63–5.
143. Moskovitz AH, Anderson BO, Yeung RS, Byrd DR, Lawton TJ, Moe RE. Axillary web syndrome after axillary dissection. *Am J Surg.* 2001 May 1;181(5):434–9.
144. Torres Lacomba M, Mayoral del Moral O, Coperias Zazo JL, Yuste Sánchez MJ, Ferrandez JC, Zapico Goñi Á. Axillary web syndrome after axillary dissection in breast cancer: a prospective study. *Breast Cancer Res Treat.* 2009 Oct 1;117(3):625–30.
145. Kilbreath SL, Refshauge KM, Beith JM, Ward LC, Simpson JM, Hansen RD. Progressive resistance training and stretching following surgery for breast cancer: study protocol for a randomised controlled trial. *BMC Cancer.* 2006 Dec 1;6:273.
146. Gould EA, Winship T, Philbin PH, Kerr HH. Observations on a ‘sentinel node’ in cancer of the parotid. *Cancer.* 1960 Feb;13:77–8.
147. Cabanas RM. An approach for the treatment of penile carcinoma. *Cancer.* 1977 Feb;39(2):456–66.
148. Morton DL, Wen DR, Wong JH, Economou JS, Cagle LA, Storm FK, et al. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg Chic Ill 1960.* 1992 Apr;127(4):392–9.
149. Krag DN, Weaver DL, Alex JC, Fairbank JT. Surgical resection and radiolocalization of the sentinel lymph node in breast cancer using a gamma probe. *Surg Oncol.* 1993 Dec;2(6):335–9; discussion 340.
150. Giuliano AE, Kirgan DM, Guenther JM, Morton DL. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. *Ann Surg.* 1994 Sep;220(3):391–401.

151. Albertini JJ, Lyman GH, Cox C, Yeatman T, Balducci L, Ku N, et al. Lymphatic Mapping and Sentinel Node Biopsy in the Patient With Breast Cancer. *JAMA*. 1996 Dec 11;276(22):1818–22.
152. Krag DN, Anderson SJ, Julian TB, Brown AM, Harlow SP, Ashikaga T, et al. Technical outcomes of sentinel-lymph-node resection and conventional axillary-lymph-node dissection in patients with clinically node-negative breast cancer: results from the NSABP B-32 randomised phase III trial. *Lancet Oncol*. 2007 Oct;8(10):881–8.
153. Bernet L, Piñero A, Vidal-Sicart S, Peg V, Giménez J, Algara M, et al. Consenso sobre la biopsia selectiva del ganglio centinela en el cáncer de mama. Revisión 2013 de la Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria. *Rev Esp Patol*. 2014 Jan;47(1):22–32.
154. Kuehn T, Bauerfeind I, Fehm T, Fleige B, Hausschild M, Helms G, et al. Sentinel-lymph-node biopsy in patients with breast cancer before and after neoadjuvant chemotherapy (SENTINA): a prospective, multicentre cohort study. *Lancet Oncol*. 2013 Jun 1;14(7):609–18.
155. Boughey JC, Suman VJ, Mittendorf EA, Ahrendt GM, Wilke LG, Taback B, et al. Sentinel Lymph Node Surgery after Neoadjuvant Chemotherapy in Patients With Node-Positive Breast Cancer: The American College of Surgeons Oncology Group (ACOSOG) Z1071 Clinical Trial. *JAMA J Am Med Assoc*. 2013 Oct 9;310(14):1455–61.
156. Mittendorf EA, Caudle AS, Yang W, Krishnamurthy S, Shaitelman S, Chavez-MacGregor M, et al. Implementation of the American College of Surgeons Oncology Group Z1071 Trial Data in Clinical Practice: Is There a Way Forward for Sentinel Lymph Node Dissection in Clinically Node-Positive Breast Cancer Patients Treated with Neoadjuvant Chemotherapy? *Ann Surg Oncol*. 2014 Aug 1;21(8):2468–73.
157. Pilewskie M, Morrow M. Axillary Nodal Management Following Neoadjuvant Chemotherapy. *JAMA Oncol*. 2017 Apr 1;3(4):549–55.



158. Li J, Chen X, Qi M, Li Y. Sentinel lymph node biopsy mapped with methylene blue dye alone in patients with breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* [Internet]. 2018 Sep 20 [cited 2020 Feb 15];13(9). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6147575/>
159. Barthelmes L, Goyal A, Sudheer P, Mansel RE. Investigation of anaphylactic reaction after patent blue V dye injection. *The Breast*. 2010 Dec 1;19(6):516–20.
160. Reyes F, Noelck M, Valentino C, Grasso-LeBeau L, Lang J. Complications of Methylene Blue Dye in Breast Surgery: Case Reports and Review of the Literature. *J Cancer*. 2010 Dec 8;2:20–5.
161. Vidal-Sicart S, Rioja Martín ME. Detección gammagráfica e intraoperatoria del ganglio centinela en el cáncer de mama. *Rev Esp Med Nucl E Imagen Mol*. 2009 Jan 1;28(1):41–3.
162. Vidal-Sicart S, Vera DR, Valdés Olmos RA. Next generation of radiotracers for sentinel lymph node biopsy: What is still necessary to establish new imaging paradigms? *Rev Espanola Med Nucl E Imagen Mol*. 2018 Dec;37(6):373–9.
163. He PS, Li F, Li GH, Guo C, Chen TJ. The combination of blue dye and radioisotope versus radioisotope alone during sentinel lymph node biopsy for breast cancer: a systematic review. *BMC Cancer* [Internet]. 2016 Feb 16 [cited 2020 Feb 15];16. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4754824/>
164. Vaz T, Costa S, Peleteiro B. Fluorescence-Guided Sentinel Lymph Node Biopsy in Breast Cancer: Detection Rate and Diagnostic Accuracy. *Acta Médica Port*. 2018 Dec 28;31(12):706–13.
165. Kitai T, Kawashima M. Transcutaneous detection and direct approach to the sentinel node using axillary compression technique in ICG fluorescence-navigated sentinel node biopsy for breast cancer. *Breast Cancer*. 2012 Oct 1;19(4):343–8.

166. Thill M, Kurylcio A, Welter R, Haasteren V van, Grosse B, Berclaz G, et al. The Central-European SentiMag study: Sentinel lymph node biopsy with superparamagnetic iron oxide (SPIO) vs. radioisotope. *The Breast*. 2014 Apr 1;23(2):175–9.
167. Teshome M, Wei C, Hunt KK, Thompson A, Rodriguez K, Mittendorf EA. Use of a Magnetic Tracer for Sentinel Lymph Node Detection in Early-Stage Breast Cancer Patients: A Meta-analysis. *Ann Surg Oncol*. 2016 May 1;23(5):1508–14.
168. Pouw JJ, Grootendorst MR, Bezooijen R, Klazen CAH, De Bruin WI, Klaase JM, et al. Pre-operative sentinel lymph node localization in breast cancer with superparamagnetic iron oxide MRI: the SentiMAG Multicentre Trial imaging subprotocol. *Br J Radiol* [Internet]. 2015 Dec [cited 2020 Feb 16];88(1056). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4984945/>
169. Ozkurt E, Yardımcı E, Tükenmez M, Ersoy YE, Yılmaz R, Cabioğlu N, et al. Intraoperative palpation of sentinel lymph nodes can accurately predict axilla in early breast cancer. *Breast J*. 2019;25(1):96–102.
170. Asadi M, Krag D. Internal mammary sentinel lymph node biopsy in clinical practice. *Int J Surg*. 2016 Dec 1;36:332–4.
171. Akay CL, Albarracin C, Torstenson T, Bassett R, Mittendorf EA, Yi M, et al. Factors Impacting the Accuracy of Intra-operative Evaluation of Sentinel Lymph Nodes in Breast Cancer. *Breast J*. 2018 Jan;24(1):28–34.
172. Layfield DM, Agrawal A, Roche H, Cutress RI. Intraoperative assessment of sentinel lymph nodes in breast cancer. *BJS Br J Surg*. 2011;98(1):4–17.
173. Schwartz GF, Giuliano AE, Veronesi U. Proceedings of the Consensus Conference on the role of sentinel lymph node biopsy in carcinoma of the breast, April 19–22, 2001, Philadelphia, Pennsylvania. *Cancer*. 2002;94(10):2542–51.
174. Nowikiewicz T, Śrutek E, Zegarski W. Original paper  
Application of immunohistochemistry for detection of metastases in sentinel lymph nodes of non-advanced breast cancer patients. *Pol J Pathol*. 2015;66(1):22–9.

175. Tamaki Y. One-step nucleic acid amplification (OSNA): where do we go with it? *Int J Clin Oncol*. 2017 Feb 1;22(1):3–10.
176. Visser M, Jiwa M, Horstman A, Brink AA, Pol RP, van Diest P, et al. Intraoperative rapid diagnostic method based on CK19 mRNA expression for the detection of lymph node metastases in breast cancer. *Int J Cancer J Int Cancer*. 2008 Jun 1;122(11):2562–7.
177. Peg V, Sansano I, Vieites B, Bernet L, Cano R, Córdoba A, et al. Role of total tumour load of sentinel lymph node on survival in early breast cancer patients. *The Breast*. 2017 Jun 1;33:8–13.
178. Rubio IT, Espinosa-Bravo M, Rodrigo M, Diaz MAV, Hardisson D, Sagasta A, et al. Nomogram including the total tumoral load in the sentinel nodes assessed by one-step nucleic acid amplification as a new factor for predicting nonsentinel lymph node metastasis in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2014 Sep 1;147(2):371–80.
179. Intraoperative molecular analysis of total tumor load in sentinel lymph node: a new predictor of axillary status in early breast cancer patients | SpringerLink [Internet]. [cited 2020 Feb 23]. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10549-013-2524-z>
180. Tamaki Y, Akiyama F, Iwase T, Kaneko T, Tsuda H, Sato K, et al. Molecular Detection of Lymph Node Metastases in Breast Cancer Patients: Results of a Multicenter Trial Using the One-Step Nucleic Acid Amplification Assay. *Clin Cancer Res*. 2009 Apr 15;15(8):2879–84.
181. Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, Müller BM, Komor M, et al. Tumor-Associated Lymphocytes As an Independent Predictor of Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 2009 Nov 16;28(1):105–13.

182. Pruneri G, Gray KP, Vingiani A, Viale G, Curigliano G, Criscitiello C, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) are a powerful prognostic marker in patients with triple-negative breast cancer enrolled in the IBCSG phase III randomized clinical trial 22-00. *Breast Cancer Res Treat.* 2016 Jul;158(2):323–31.
183. Ali HR, Provenzano E, Dawson SJ, Blows FM, Liu B, Shah M, et al. Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12 439 patients. *Ann Oncol.* 2014 Aug 1;25(8):1536–43.
184. Yang X, Rao J, Yang W, Shui R. Evaluation of the Predictive and Prognostic Values of Stromal Tumor-Infiltrating Lymphocytes in HER2-Positive Breast Cancers treated with neoadjuvant chemotherapy. *Target Oncol.* 2018 Dec;13(6):757–67.
185. Issa-Nummer Y, Darb-Esfahani S, Loibl S, Kunz G, Nekljudova V, Schrader I, et al. Prospective validation of immunological infiltrate for prediction of response to neoadjuvant chemotherapy in HER2-negative breast cancer--a substudy of the neoadjuvant GeparQuinto trial. *PloS One.* 2013;8(12):e79775.
186. Dieci MV, Criscitiello C, Goubar A, Viale G, Conte P, Guarneri V, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes on residual disease after primary chemotherapy for triple-negative breast cancer: a retrospective multicenter study. *Ann Oncol.* 2014 Mar;25(3):611–8.
187. Miyashita M, Sasano H, Tamaki K, Hirakawa H, Takahashi Y, Nakagawa S, et al. Prognostic significance of tumor-infiltrating CD8+ and FOXP3+ lymphocytes in residual tumors and alterations in these parameters after neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer: a retrospective multicenter study. *Breast Cancer Res BCR.* 2015 Sep 4;17:124.
188. Cimino-Mathews A, Ye X, Meeker A, Argani P, Emens LA. Metastatic Triple Negative Breast Cancers at First Relapse Have Fewer Tumor-Infiltrating Lymphocytes Than Their Matched Primary Breast Tumors: A Pilot Study. *Hum Pathol.* 2013 Oct;44(10):2055–63.

189. Ogiya R, Niikura N, Kumaki N, Bianchini G, Kitano S, Iwamoto T, et al. Comparison of tumor-infiltrating lymphocytes between primary and metastatic tumors in breast cancer patients. *Cancer Sci.* 2016 Dec;107(12):1730–5.
190. Veronesi U, Paganelli G, Viale G, Luini A, Zurrada S, Galimberti V, et al. A Randomized Comparison of Sentinel-Node Biopsy with Routine Axillary Dissection in Breast Cancer [Internet]. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa012782>. 2009 [cited 2020 Feb 27]. Available from: [https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa012782?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3Dwww.ncbi.nlm.nih.gov](https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa012782?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dwww.ncbi.nlm.nih.gov)
191. Donker M, van Tienhoven G, Straver ME, Meijnen P, van de Velde CJH, Mansel RE, et al. Radiotherapy or surgery of the axilla after a positive sentinel node in breast cancer (EORTC 10981-22023 AMAROS): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 non-inferiority trial. *Lancet Oncol.* 2014 Nov;15(12):1303–10.
192. Degenim AC, Griffith KA, Sabel MS, Hayes DF, Cimmino VM, Diehl KM, et al. Clinicopathologic features of metastasis in nonsentinel lymph nodes of breast carcinoma patients. *Cancer.* 2003 Dec 1;98(11):2307–15.
193. Goyal A, Mann GB, Fallowfield L, Duley L, Reed M, Dodwell D, et al. POSNOC-POSitive Sentinel NOde: adjuvant therapy alone versus adjuvant therapy plus Clearance or axillary radiotherapy: a randomised controlled trial of axillary treatment in women with early-stage breast cancer who have metastases in one or two sentinel nodes. *BMJ Open.* 2021 Dec 2;11(12):e054365.
194. Gentilini O, Veronesi U. Abandoning sentinel lymph node biopsy in early breast cancer? A new trial in progress at the European Institute of Oncology of Milan (SOUND: Sentinel node vs Observation after axillary UltraSOUND). *The Breast.* 2012 Oct 1;21(5):678–81.

195. Gentilini O, Botteri E, Dadda P, Sangalli C, Boccardo C, Peradze N, et al. Physical function of the upper limb after breast cancer surgery. Results from the SOUND (Sentinel node vs. Observation after axillary Ultra-souND) trial. *Eur J Surg Oncol*. 2016 May 1;42(5):685–9.
196. Giuliano AE, Hawes D, Ballman KV, Whitworth PW, Blumencranz PW, Reintgen DS, et al. Association of occult metastases in sentinel lymph nodes and bone marrow with survival among women with early-stage invasive breast cancer. *JAMA*. 2011 Jul 27;306(4):385–93.
197. Galimberti V, Cole BF, Viale G, Veronesi P, Vicini E, Intra M, et al. Axillary dissection versus no axillary dissection in patients with breast cancer and sentinel-node micrometastases (IBCSG 23-01): 10-year follow-up of a randomised, controlled phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2018 Oct 1;19(10):1385–93.
198. Rayhanabad J, Yegiyants S, Putschakayala K, Haig P, Romero L, Difronzo LA. Axillary recurrence is low in patients with breast cancer who do not undergo completion axillary lymph node dissection for micrometastases in sentinel lymph nodes. *Am Surg*. 2010 Oct;76(10):1088–91.
199. Giuliano AE, Hunt KK, Ballman KV, Beitsch PD, Whitworth PW, Blumencranz PW, et al. Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis: a randomized clinical trial. *JAMA*. 2011 Feb 9;305(6):569–75.
200. Van Zee KJ, Manasseh DME, Bevilacqua JLB, Boolbol SK, Fey JV, Tan LK, et al. A nomogram for predicting the likelihood of additional nodal metastases in breast cancer patients with a positive sentinel node biopsy. *Ann Surg Oncol*. 2003 Dec;10(10):1140–51.
201. Goyal A, Douglas-Jones A, Newcombe RG, Mansel RE, ALMANAC Trialists Group. Predictors of non-sentinel lymph node metastasis in breast cancer patients. *Eur J Cancer Oxf Engl 1990*. 2004 Jul;40(11):1731–7.

202. Degnim AC, Reynolds C, Pantvaidya G, Zakaria S, Hoskin T, Barnes S, et al. Nonsentinel node metastasis in breast cancer patients: assessment of an existing and a new predictive nomogram. *Am J Surg*. 2005 Oct;190(4):543–50.
203. Pal A, Provenzano E, Duffy SW, Pinder SE, Purushotham AD. A model for predicting non-sentinel lymph node metastatic disease when the sentinel lymph node is positive. *Br J Surg*. 2008 Mar 1;95(3):302–9.
204. Katz A, Smith BL, Golshan M, Niemierko A, Kobayashi W, Raad RA, et al. Nomogram for the Prediction of Having Four or More Involved Nodes for Sentinel Lymph Node-Positive Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 2008 May;26(13):2093–8.
205. Meretoja TJ, Leidenius MHK, Heikkilä PS, Boross G, Sejben I, Regitnig P, et al. International Multicenter Tool to Predict the Risk of Nonsentinel Node Metastases in Breast Cancer. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2012 Dec 19;104(24):1888–96.
206. Hwang RF, Krishnamurthy S, Hunt KK, Mirza N, Ames FC, Feig B, et al. Clinicopathologic factors predicting involvement of nonsentinel axillary nodes in women with breast cancer. *Ann Surg Oncol*. 2003 Apr;10(3):248–54.
207. Barranger E, Coutant C, Flahault A, Delpech Y, Darai E, Uzan S. An axilla scoring system to predict non-sentinel lymph node status in breast cancer patients with sentinel lymph node involvement. *Breast Cancer Res Treat*. 2005 May;91(2):113–9.
208. Kohrt HE, Olshen RA, Bermas HR, Goodson WH, Wood DJ, Henry S, et al. New models and online calculator for predicting non-sentinel lymph node status in sentinel lymph node positive breast cancer patients. *BMC Cancer*. 2008 Mar 4;8:66.
209. Ménard S, Tomasic G, Casalini P, Balsari A, Pilotti S, Cascinelli N, et al. Lymphoid infiltration as a prognostic variable for early-onset breast carcinomas. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 1997 May;3(5):817–9.

210. Savas P, Salgado R, Denkert C, Sotiriou C, Darcy PK, Smyth MJ, et al. Clinical relevance of host immunity in breast cancer: from TILs to the clinic. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016 Apr;13(4):228–41.
211. Loi S, Sirtaine N, Piette F, Salgado R, Viale G, Van Eeno F, et al. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2013 Mar 1;31(7):860–7.
212. Mahmoud SMA, Lee AHS, Paish EC, Macmillan RD, Ellis IO, Green AR. The prognostic significance of B lymphocytes in invasive carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res Treat*. 2012 Apr;132(2):545–53.
213. Liu F, Lang R, Zhao J, Zhang X, Pringle GA, Fan Y, et al. CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cell and FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cell infiltration in relation to breast cancer survival and molecular subtypes. *Breast Cancer Res Treat*. 2011 Nov;130(2):645–55.
214. Ladoire S, Arnould L, Apetoh L, Coudert B, Martin F, Chauffert B, et al. Pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy of breast carcinoma is associated with the disappearance of tumor-infiltrating foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2008 Apr 15;14(8):2413–20.
215. Ono M, Tsuda H, Shimizu C, Yamamoto S, Shibata T, Yamamoto H, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes are correlated with response to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2012 Apr;132(3):793–805.
216. Yamaguchi R, Tanaka M, Yano A, Tse GM, Yamaguchi M, Koura K, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes are important pathologic predictors for neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer. *Hum Pathol*. 2012 Oct;43(10):1688–94.



217. Denkert C, Wienert S, Poterie A, Loibl S, Budczies J, Badve S, et al. Standardized evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer: results of the ring studies of the international immuno-oncology biomarker working group. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* 2016 Oct;29(10):1155–64.
218. Miyoshi Y, Shien T, Ogiya A, Ishida N, Yamazaki K, Horii R, et al. Associations in tumor infiltrating lymphocytes between clinicopathological factors and clinical outcomes in estrogen receptor-positive/human epidermal growth factor receptor type 2 negative breast cancer. *Oncol Lett.* 2019 Feb;17(2):2177–86.
219. Jang N, Kwon HJ, Park MH, Kang SH, Bae YK. Prognostic Value of Tumor-Infiltrating Lymphocyte Density Assessed Using a Standardized Method Based on Molecular Subtypes and Adjuvant Chemotherapy in Invasive Breast Cancer. *Ann Surg Oncol.* 2018 Apr;25(4):937–46.
220. Huang J, Chen X, Fei X, Huang O, Wu J, Zhu L, et al. Changes of Tumor Infiltrating Lymphocytes after Core Needle Biopsy and the Prognostic Implications in Early Stage Breast Cancer: A Retrospective Study. *Cancer Res Treat.* 2019 Oct;51(4):1336–46.
221. Belkacem O, Bacha D, Rahoui N, Zran MD, Lahmar A, Slama SB. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes (TILS) and their association with clinicopathological features in breast cancer: A retrospective study involving 53 cases. *Rev Senol Patol Mamar.* 2022 Jul 1;35(3):160–6.
222. Hida AI, Sagara Y, Yotsumoto D, Kanemitsu S, Kawano J, Baba S, et al. Prognostic and predictive impacts of tumor-infiltrating lymphocytes differ between Triple-negative and HER2-positive breast cancers treated with standard systemic therapies. *Breast Cancer Res Treat.* 2016;158:1–9.
223. Yamashita H, Ogiya A, Shien T, Horimoto Y, Masuda N, Inao T, et al. Clinicopathological factors predicting early and late distant recurrence in estrogen receptor-positive, HER2-negative breast cancer. *Breast Cancer.* 2016 Nov;23(6):830–43.

224. Teramoto A, Shimazu K, Naoi Y, Shimomura A, Shimoda M, Kagara N, et al. One-step nucleic acid amplification assay for intraoperative prediction of non-sentinel lymph node metastasis in breast cancer patients with sentinel lymph node metastasis. *The Breast*. 2014 Oct 1;23(5):579–85.
225. Blok EJ, Engels CC, Dekker-Ensink G, Meershoek-Klein Kranenbarg E, Putter H, Smit VTHBM, et al. Exploration of tumour-infiltrating lymphocytes as a predictive biomarker for adjuvant endocrine therapy in early breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2018 Aug 1;171(1):65–74.
226. Krishnamurti U, Wetherilt CS, Yang J, Peng L, Li X. Tumor-infiltrating lymphocytes are significantly associated with better overall survival and disease-free survival in triple-negative but not estrogen receptor-positive breast cancers. *Hum Pathol*. 2017 Jun;64:7–12.
227. Peg V, Espinosa-Bravo M, Vieites B, Vilardell F, Antúnez JR, de Salas MS, et al. Intraoperative molecular analysis of total tumor load in sentinel lymph node: a new predictor of axillary status in early breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2013 May 1;139(1):87–93.
228. Espinosa-Bravo M, Sansano I, Pérez-Hoyos S, Ramos M, Sancho M, Xercavins J, et al. Prediction of non-sentinel lymph node metastasis in early breast cancer by assessing total tumoral load in the sentinel lymph node by molecular assay. *Eur J Surg Oncol J Eur Soc Surg Oncol Br Assoc Surg Oncol*. 2013 Jul;39(7):766–73.
229. Nabais C, Figueiredo J, Lopes P, Martins M, Araújo A. Total tumor load assessed by one-step nucleic acid amplification assay as an intraoperative predictor for non-sentinel lymph node metastasis in breast cancer. *The Breast*. 2017 Apr 1;32:33–6.
230. Ohi Y, Umekita Y, Sagara Y, Rai Y, Yotsumoto D, Matsukata A, et al. Whole sentinel lymph node analysis by a molecular assay predicts axillary node status in breast cancer. *Br J Cancer*. 2012 Oct 9;107(8):1239–43.

231. Laohawiriyakamol S, Mahattanobon S, Puttawibul P. Intraoperative Molecular Analysis of Total Tumor Load in Sentinel Lymph Node: A Predictor of Axillary Status in Early Breast Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2022 Jan 1;23(1):349–54.