




**CARGA TUMORAL TOTAL EN EL GANGLIO  
CENTINELA DE PACIENTES CON CÁNCER DE  
MAMA EN ESTADIOS INICIALES**

**TESIS DOCTORAL UAB / 2015**



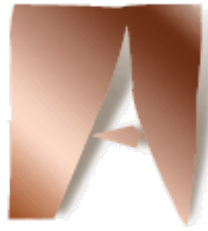
**Universitat  
Autònoma  
de Barcelona**



**Vicente Peg Cámara**







**Universitat  
Autònoma  
de Barcelona**

Departamento de Ciencias Morfológicas

Facultad de Medicina

Barcelona, 2015

**CARGA TUMORAL TOTAL EN EL GANGLIO  
CENTINELA DE PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA  
EN ESTADIOS INICIALES**

Vicente Peg Cámara

Esta tesis se desarrolló en el Departamento de Anatomía Patológica del H.U. Vall d'Hebron bajo la supervisión de los directores doctores:

Santiago Ramón y Cajal Agüeras

Isabel Teresa Rubio Rodríguez

Josep Lluís Parra Palau



Barcelona, 2015

El Dr. Santiago Ramón y Cajal, catedrático del Departamento de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona y Jefe de Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Vall d'Hebron.

CERTIFICA:

Que la tesis titulada "**CARGA TUMORAL TOTAL EN EL GANGLIO CENTINELA DE PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA EN ESTADIOS INICALES**" y dirigida por los abajo firmantes es apta para ser defendida delante del Tribunal correspondiente para optar al grado de Doctor.

Prof. Santiago Ramón y Cajal  
Barcelona, 6 de febrero de 2015

Directores de la tesis:

|   |                                       |
|---|---------------------------------------|
| <b>Dr. Santiago Ramón y Cajal Agüeras</b> | <b>Dra. Isabel T. Rubio Rodríguez</b> |
| Departamento Anatomía Patológica          | Unidad de Patología Mamaria           |
| H. U. Vall d'Hebron, Barcelona            | H.U. Vall d'Hebron, Barcelona         |

**Dr. Josep Lluís Parra Palau**  
Vall d'Hebron Institut d'Oncologia, Barcelona



A Guille, Hugo y Elena: por todo  
A mis padres y hermanos: por lo mismo.





La presente tesis doctoral se ha estructurado siguiendo la Normativa interna de la Universidad Autónoma de Barcelona para la presentación de tesis doctorales como compendio de publicaciones, aprobada por Comisión de Doctorado de la Facultad de Medicina.

Los trabajos que forman parte de la memoria del proyecto de tesis doctoral pertenecen a la misma línea de investigación, enmarcada en la definición y valor del concepto de Carga Tumoral Total determinada mediante técnicas moleculares en el ganglio centinela de las pacientes con cáncer de mama en estadios iniciales y su valor clínico. Como resultado de estos trabajos se han publicado dos artículos originales en la Literatura internacional.



Cierto que casi siempre se encuentra algo, si se mira,  
pero no siempre es lo que uno busca

*Extracto de "El hobbit", de J.R.R. Tolkien (1892-1973)*



# ÍNDICE



|   |    |
|---|----|
| Abreviaturas empleadas  | 17 |
| Introducción. Planteamiento general y justificación de la tesis | 19 |
| Hipótesis   | 37 |
| Objetivos   | 41 |
| Publicaciones: métodos y resultados                             | 45 |
| Discusión   | 53 |
| Conclusiones  | 63 |
| Bibliografía  | 67 |
| Agradecimientos   | 73 |





|         |  |
|---------|--|
| AJCC    | American Joint Committee on Cancer                                       |
| ARNm    | ARN mensajero  |
| AUC     | Area Under Curve (área bajo la curva)                                    |
| BLN     | Breast Lymph Node Assay  |
| CDI     | Carcinoma ductal infiltrante   |
| CK19    | Citoqueratina 19   |
| CLI     | Carcinoma lobulillar infiltrante   |
| GC      | Ganglio centinela  |
| LA      | Linfadenectomía axilar   |
| RT-LAMP | Trascricpción reversa con amplificación isotérmica<br>mediada por bucles |
| RT-PCR  | Reacción en cadena de la polimerasa con<br>transcriptasa inversa         |
| TTL     | Total Tumor Load (Carga Tumoral Total)                                   |
| OMS     | Organización Mundial de la Salud   |
| OSNA    | One Step Nucleic Acid Amplification                                      |
| UICC    | Union for International Cancer Control                                   |



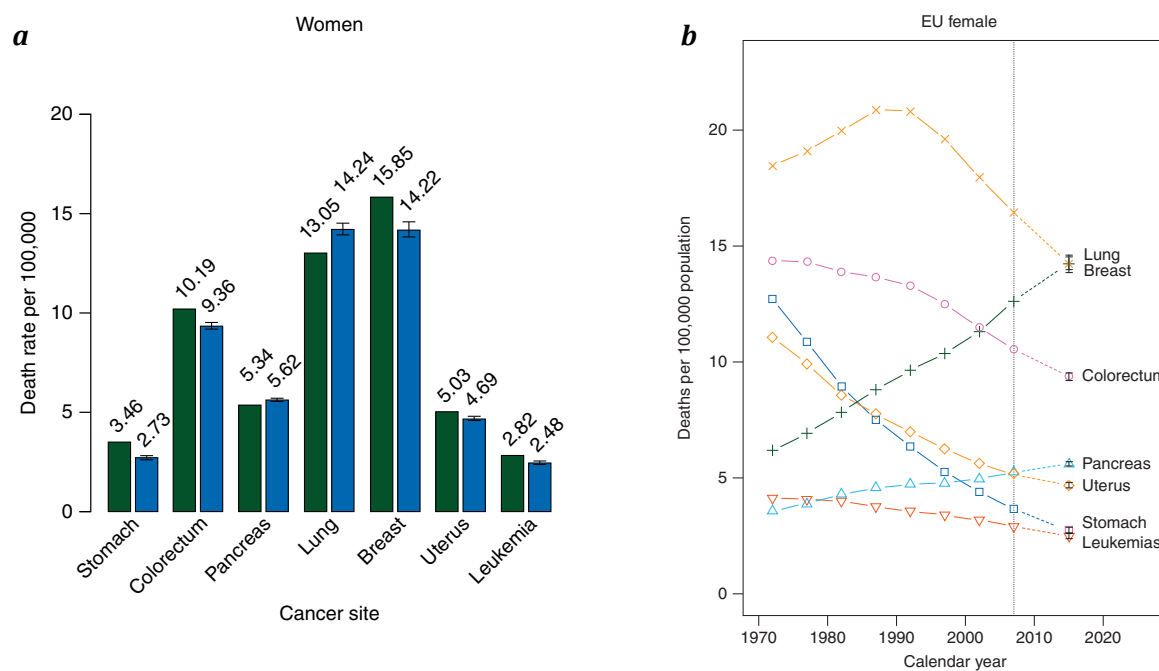
# **INTRODUCCIÓN**

## **Planteamiento general y justificación de la tesis**



## 1.- EPIDEMIOLOGÍA:

A nivel mundial, el cáncer de mama es la neoplasia maligna más frecuentemente diagnosticada, con más de 1000000 casos/año, así como la principal causa de muerte por cáncer en mujeres<sup>1</sup>. En Europa representa el 23% de los tumores malignos de la mujer y el 27% en los países en desarrollo, siendo dos veces más frecuente que el cáncer de cualquier otra localización<sup>2,3</sup>. Sin embargo, la previsión es que el cáncer de mama y colorrectal disminuyan su tasa de mortalidad en 2015 (-10% y -8%), aunque se prevé un auge del 9% del cáncer de pulmón en mujeres, por lo que probablemente acabe superando las tasas del cáncer de mama (aunque el número total de muertes seguirá siendo mayor para el cáncer de mama - 90800 vs 87500 -)<sup>4</sup>.



**Figura 1. Mortalidad por cáncer en mujeres a nivel mundial (a) y en Europa (b). Las barras verdes corresponden al año 2009 y las azules a la previsión para el 2015 (a).**

## 2.- ESTADIFICACIÓN DEL CÁNCER DE MAMA:

El pronóstico en general de las pacientes con cáncer de mama se basa en diferentes factores, que incluyen a edad al diagnóstico, las características del

tumor, el grado de malignidad, la expresión de receptores hormonales y la presencia de metástasis en los ganglios axilares.

El sistema de clasificación más extensamente empleado a nivel mundial es el TNM publicado por el American Joint Committee on Cancer (AJCC)/Union for International Cancer Control (UICC)<sup>5</sup>. En él se tienen en cuenta el tamaño del tumor (tumor o T), los ganglios axilares regionales (nódulos o N) y la afectación metastásica a distancia (metástasis o M). La T, N y M se combinan para crear 5 estadios clínicos (0, I, II, III y IV) que resumen la extensión regional (tamaño tumoral, extensión a piel o pared torácica, afectación axilar) y las metástasis a distancia. Esta información es importante tanto para la toma de decisiones con vistas al manejo local como para determinar la necesidad de un tratamiento sistémico.

La clasificación TNM se va mejorando en función de los nuevos avances en cáncer de mama. De esta forma, desde la introducción de la biopsia del ganglio centinela (GC) y el estudio más detallado del mismo, incluyendo las secciones seriadas y la inmunohistoquímica, la clasificación se tuvo que modificar para incluir en el estadiaje la detección de volúmenes cada vez más pequeños de tumor en el GC. Una de las limitaciones de la 6ª edición con respecto al GC era el sistema de caracterización de la carga tumoral basado en el tamaño del clúster de células neoplásicas. Por esta necesidad, en la 7ª edición se incluyó una clasificación de las células tumorales aisladas valorando tanto los clúster de células tumorales como las células tumorales únicas. Otros cambios en la 7ª edición también incluyeron una nueva categoría M0(i+) para designar las células tumorales circulantes detectadas en la sangre o en la médula ósea, y el desdoblamiento del Estadio I en IA y IB al diferenciar las micrometástasis en el GC como IB frente a N0 en el IA. Pero al final, la mayor parte de la controversia acerca de que método es mejor para analizar anatómo-patológicamente el GC radica en el debate acerca del valor predictivo de estas mínimas metástasis en el GC y su significación clínica.

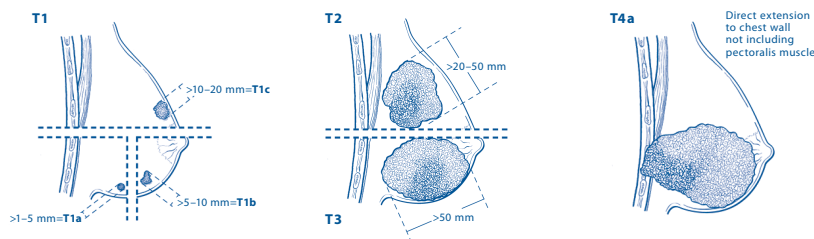
En los últimos años se ha ido demostrando que el cáncer de mama es una enfermedad heterogénea. En el año 2000 Charles Perou consiguió caracterizarla estudiando los patrones de expresión de los genes de 65 tumores de mama



utilizando microarrays de ADN<sup>6</sup>. De esta forma los tumores se clasificaron en cuatro grandes subtipos (basal-like, HER2-enriquecido, normal-like y luminales) determinados por las diferencias que abundan en sus patrones de expresión. Estos subtipos moleculares son pronósticos en cáncer de mama y esto hace que en la actualidad el pronóstico de las pacientes con cáncer de mama no sólo esté basado en el estadiaje sino también en los subtipos moleculares.

En el futuro, el mayor desafío de la clasificación TNM será incorporar los avances en los factores biológicos del cáncer de mama que predicen los resultados oncológicos y la respuesta a los tratamientos al simple estadiaje anatómico. Los nuevos tests moleculares basados en plataformas de expresión génica (tales como Mammaprint®, OncotypeDX® o PAM50) pueden completar esta información estimando el riesgo de futuras metástasis, recidivas o previendo la respuesta al tratamiento.

American Joint Committee on Cancer  
**Breast Cancer Staging** 7th EDITION



**Primary Tumor (T)**

- Tx** Primary tumor cannot be assessed
- T0** No evidence of primary tumor
- Tis** Carcinoma in situ
  - Tis (DCIS)** Ductal carcinoma in situ
  - Tis (LCIS)** Lobular carcinoma in situ
- Tis (Paget's)** Paget's disease of the nipple NOT associated with invasive carcinoma and/or carcinoma in situ (DCIS and/or LCIS) in the underlying breast parenchyma. Carcinomas in the breast parenchyma associated with Paget's disease are categorized based on the size and characteristics of the parenchymal disease, although the presence of Paget's disease should still be noted

- T1** Tumor ≤ 20 mm in greatest dimension
- T1mi** Tumor ≤ 1 mm in greatest dimension
- T1a** Tumor > 1 mm but ≤ 5 mm in greatest dimension
- T1b** Tumor > 5 mm but ≤ 10 mm in greatest dimension
- T1c** Tumor > 10 mm but ≤ 20 mm in greatest dimension
- T2** Tumor > 20 mm but ≤ 50 mm in greatest dimension
- T3** Tumor > 50 mm in greatest dimension

- T4** Tumor of any size with direct extension to the chest wall and/or to the skin (ulceration or skin nodules) Note: Invasion of the dermis alone does not qualify as T4
- T4a** Extension to the chest wall, not including only pectoralis muscle adherence/invasion
- T4b** Ulceration and/or ipsilateral satellite nodules and/or edema (including peau d'orange) of the skin, which do not meet the criteria for inflammatory carcinoma
- T4c** Both T4a and T4b
- T4d** Inflammatory carcinoma (see "Rules for Classification")

**Distant Metastases (M)**

- M0** No clinical or radiographic evidence of distant metastases
- cM0(+)** No clinical or radiographic evidence of distant metastases, but deposits of molecularly or microscopically detected tumor cells in circulating blood, bone marrow, or other nonregional nodal tissue that are no larger than 0.2 mm in a patient without symptoms or signs of metastases
- M1** Distant detectable metastases as determined by classic clinical and radiographic means and/or histologically proven larger than 0.2 mm

| ANATOMIC STAGE/PROGNOSTIC GROUPS |       |       |    |
|----------------------------------|-------|-------|----|
| Stage 0                          | Tis   | N0    | M0 |
| Stage IA                         | T1*   | N0    | M0 |
| Stage IB                         | T0    | N1mi  | M0 |
|                                  | T1*   | N1mi  | M0 |
| Stage IIA                        | T0    | N1**  | M0 |
|                                  | T1*   | N1**  | M0 |
| Stage IIB                        | T2    | N0    | M0 |
|                                  | T2    | N1    | M0 |
| Stage IIIA                       | T3    | N0    | M0 |
|                                  | T0    | N2    | M0 |
|                                  | T1*   | N2    | M0 |
|                                  | T2    | N2    | M0 |
| Stage IIIB                       | T3    | N1    | M0 |
|                                  | T3    | N2    | M0 |
|                                  | T4    | N0    | M0 |
| Stage IIIC                       | T4    | N1    | M0 |
|                                  | T4    | N2    | M0 |
| Stage IIIC                       | Any T | N3    | M0 |
| Stage IV                         | Any T | Any N | M1 |

**Notes**

- \* T1 includes T1mi.
- \*\* T0 and T1 tumors with nodal micrometastases only are excluded from Stage IIA and are classified Stage IB.
- M0 includes M0(+).
- The designation pM0 is not valid; any M0 should be clinical.
- If a patient presents with M1 prior to neoadjuvant systemic therapy, the stage is considered Stage IV and remains Stage IV regardless of response to neoadjuvant therapy.
- Stage designation may be changed if postsurgical imaging studies reveal the presence of distant metastases, provided that the studies are carried out within 4 months of diagnosis in the absence of disease progression and provided that the patient has not received neoadjuvant therapy.
- Postneoadjuvant therapy is designated with "yc" or "yp" prefix. Of note, no stage group is assigned if there is a complete pathologic response (CR) to neoadjuvant therapy, for example, ypT0ypN0M0.



Financial support for AJCC 7th Edition Staging Posters provided by the American Cancer Society



Copyright © 2010 American Joint Committee on Cancer • Printed with permission from the AJCC

American Joint Committee on Cancer  
**Breast Cancer Staging** 7th EDITION

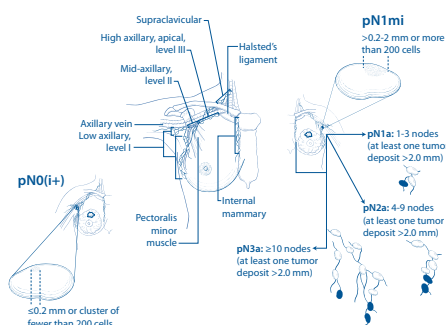
**Regional Lymph Nodes (N)**

**CLINICAL**

- NX Regional lymph nodes cannot be assessed (for example, previously removed)
- N0 No regional lymph node metastases
- N1 Metastases to movable ipsilateral level I, II axillary lymph node(s)
- N2 Metastases in ipsilateral level I, II axillary lymph nodes that are clinically fixed or matted; or in clinically detected\* ipsilateral internal mammary nodes in the absence of clinically evident axillary lymph node metastases
- N2a Metastases in ipsilateral level I, II axillary lymph nodes fixed to one another (matted) to other structures
- N2b Metastases only in clinically detected\* ipsilateral internal mammary nodes and in the absence of clinically evident level I, II axillary lymph node metastases
- N3 Metastases in ipsilateral infraclavicular (level III axillary) lymph node(s) with or without level I, II axillary lymph node involvement; or in clinically detected\* ipsilateral internal mammary lymph node(s) with clinically evident level I, II axillary lymph node metastases; or metastases in ipsilateral supraclavicular lymph node(s) with or without axillary or internal mammary lymph node involvement
- N3a Metastases in ipsilateral infraclavicular lymph node(s)
- N3b Metastases in ipsilateral internal mammary lymph node(s) and axillary lymph node(s)
- N3c Metastases in ipsilateral supraclavicular lymph node(s)

**Notes**

\* "Clinically detected" is defined as detected by imaging studies (excluding lymphoscintigraphy) or by clinical examination and having characteristics highly suspicious for malignancy or a presumed pathologic macrometastasis based on fine needle aspiration biopsy with cytologic examination. Confirmation of clinically detected metastatic disease by fine needle aspiration without excision biopsy is designated with an (I) suffix, for example, cI3a(I). Excisional biopsy of a lymph node or biopsy of a sentinel node, in the absence of assignment of a pI, is classified as a clinical N, for example, cN1. Information regarding the confirmation of the nodal status will be designated in site-specific factors as clinical, fine needle aspiration, core biopsy, or sentinel lymph node biopsy. Pathologic classification (pN) is used for excision or sentinel lymph node biopsy only in conjunction with a pathologic T assignment.



**PATHOLOGIC (PN)\***

- pNX Regional lymph nodes cannot be assessed (for example, previously removed, or not removed for pathologic study)
- pN0 No regional lymph node metastasis identified histologically  
 Note: Isolated tumor cell clusters (ITC) are defined as small clusters of cells not greater than 0.2 mm, or single tumor cells, or a cluster of fewer than 200 cells in a single histologic cross-section. ITCs may be detected by routine histology or by immunohistochemical (IHC) methods. Nodes containing only ITCs are excluded from the total positive node count for purposes of N classification but should be included in the total number of nodes evaluated.
- pN0(-) No regional lymph node metastases histologically, negative IHC
- pN0(+) Malignant cells in regional lymph node(s) no greater than 0.2 mm (detected by H&E or IHC including ITC)
- pN0(mol-) No regional lymph node metastases histologically, negative molecular findings (RT-PCR) detected by histology or IHC
- pN0(mol+) Positive molecular findings; (RT-PCR)\*\*; but no regional lymph node metastases detected by histology or IHC
- pN1 Micrometastases, or metastases in 1-3 axillary lymph nodes; and/or in internal mammary nodes with metastases detected by sentinel lymph node biopsy but not clinically detected\*\*\*
- pN1mi Micrometastases (greater than 0.2 mm and/or more than 200 cells, but none greater than 2.0 mm)
- pN1a Metastases in 1-3 axillary lymph nodes, at least one metastasis greater than 2.0 mm
- pN1b Metastases in internal mammary nodes with micrometastases or macrometastases detected by sentinel lymph node biopsy but not clinically detected\*\*\*
- pN1c Metastases in 1-3 axillary lymph nodes and in internal mammary lymph nodes with micrometastases or macrometastases detected by sentinel lymph node biopsy but not clinically detected
- pN2 Metastases in 4-9 axillary lymph nodes; or in clinically detected\*\*\*\* internal mammary lymph nodes in the absence of axillary lymph node metastases
- pN2a Metastases in 4-9 axillary lymph nodes (at least one tumor deposit greater than 2.0 mm)
- pN2b Metastases in clinically detected\*\*\*\* internal mammary lymph nodes in the absence of axillary lymph node metastases
- pN3 Metastases in 10 or more axillary lymph nodes; or in infraclavicular (level III axillary) lymph nodes; or in clinically detected\*\*\*\* ipsilateral internal mammary lymph nodes in the presence of one or more positive level I, II axillary lymph nodes; or in more than three axillary lymph nodes and in internal mammary lymph nodes with micrometastases or macrometastases detected by sentinel lymph node biopsy but not clinically detected\*\*\*; or in ipsilateral supraclavicular lymph nodes
- pN3a Metastases in 10 or more axillary lymph nodes (at least one tumor deposit greater than 2.0 mm); or metastases to the infraclavicular (level III axillary) lymph nodes
- pN3b Metastases in clinically detected\*\*\*\* ipsilateral internal mammary lymph nodes in the presence of one or more positive axillary lymph nodes; or in more than three axillary lymph nodes and in internal mammary lymph nodes with micrometastases or macrometastases detected by sentinel lymph node biopsy but not clinically detected\*\*\*
- pN3c Metastases in ipsilateral supraclavicular lymph nodes

**Notes**

\* Classification is based on axillary lymph node dissection with or without sentinel lymph node biopsy. Classification based solely on sentinel lymph node biopsy without subsequent axillary lymph node dissection is designated (sn) for "sentinel node," for example, pN0(sn).  
 \*\* RT-PCR: reverse transcriptase/polymerase chain reaction.  
 \*\*\* "Not clinically detected" is defined as not detected by imaging studies (excluding lymphoscintigraphy) or not detected by clinical examination.  
 \*\*\*\* "Clinically detected" is defined as detected by imaging studies (excluding lymphoscintigraphy) or by clinical examination and having characteristics highly suspicious for malignancy or a presumed pathologic macrometastasis based on fine needle aspiration biopsy with cytologic examination.



Financial support for AJCC 7th Edition Staging Posters provided by the American Cancer Society



Copyright © 2009 American Joint Committee on Cancer • Printed with permission from the AJCC

**Figura 2. Estadificación TNM según la AJCC (7ª edición)**

**2.1.- Importancia de la linfadenectomía axilar**

La afectación de ganglios linfáticos axilares sigue siendo el principal factor pronóstico en el cáncer de mama en estadios iniciales. Por ese motivo los primeros procedimientos quirúrgicos contemplaban la linfadenectomía axilar (LA) como método de elección, en la que se disecan aproximadamente 2/3 de los ganglios axilares para su estudio histológico.

La incidencia de afectación axilar en el momento del diagnóstico se relaciona con múltiples características del tumor primario, tales como el tamaño. A pesar de esto, hasta un 20% de tumores ocultos o menores de 10 mm se asocian con

metástasis ganglionares. Otro factor que correlaciona con el riesgo de afectación axilar es el estadio clínico. De este modo pacientes en estadio I, en los que clínicamente no se objetiva afectación ganglionar, el porcentaje de casos con ganglios invadidos llega al 20-40% mientras que en estadio II hasta el 40% no tendrá ganglios infiltrados<sup>7,8</sup>. Por este motivo, aproximadamente un tercio de los estadios clínicos resulta incorrecto, lo que explica el énfasis que puso Danforth en justificar la LA como un método que permite una correcta estadificación del tumor<sup>7</sup>. Fisher demostró que cuando se extirpaban y examinaban menos de 10 ganglios axilares, 11% de los pacientes tienen 4 o más ganglios infiltrados pero cuando se examinan 25 o más ganglios el porcentaje asciende al 24%<sup>9</sup>. Estos datos justifican la disección de un número mínimo y representativo de ganglios de los niveles I y II de la axila<sup>10,11</sup>.

A medida que aumenta el número de ganglios axilares afectados, la supervivencia global y libre de enfermedad a 5 y 10 años empeora. En los pacientes sin afectación ganglionar, el riesgo de recidiva local oscila entre el 0 y el 11% mientras que llega al 40-50% en aquellos casos con 4 o más ganglios positivos. La tasa de recidivas axilares también viene determinada por la presencia o no de ganglios invadidos así como por la extensión de la LA. En situaciones con disecciones axilares completas, la tasa de recidivas es inferior al 5% mientras que los pacientes con ganglios negativos pero sin cirugía axilar (mastectomía total, por ejemplo) alcanzaban tasas del 20-25%, como demostró el estudio NSABP-04<sup>7,8</sup>. Estos datos justificaban por lo tanto la LA para lograr un mejor control local de la enfermedad<sup>12</sup>.

Las indicaciones para realizar una linfadenectomía axilar en pacientes con cáncer de mama han sido tres: estadificación del cáncer de mama, control local y mejora en la supervivencia, siendo aún hoy este último punto bastante controvertido. Con los resultados del ensayo clínico NSABP B04<sup>13</sup> — que definió la LA como un procedimiento de estadificación y de prevención de la recidiva axilar, sin impacto en la supervivencia —, hubo un cambio en la percepción del papel de la LA en el cáncer de mama. Aunque este fue un estudio clave, una de sus limitaciones fue la falta de potencia suficiente para detectar pequeños beneficios en la supervivencia por la LA. Otros meta-análisis, sin embargo, han

encontrado un beneficio de la LA en la supervivencia de un 5,4%<sup>14</sup>. La controversia acerca de si la LA tiene impacto en la supervivencia de las pacientes sigue siendo objeto de debate

Sin embargo, cerca del 50% de las pacientes con cáncer de mama no presentan afectación axilar y no se benefician por lo tanto de la LA. Además, ésta se asocia con un riesgo considerable de morbilidad en el brazo en forma de dolor, edema o pérdida de la movilidad<sup>15,16</sup>. Por este motivo se desarrolló el concepto del ganglio centinela (GC) para identificar a aquellas pacientes que no precisan una LA y evitar los efectos secundarios de la misma.

### **3.- CONCEPTO DE GANGLIO CENTINELA:**

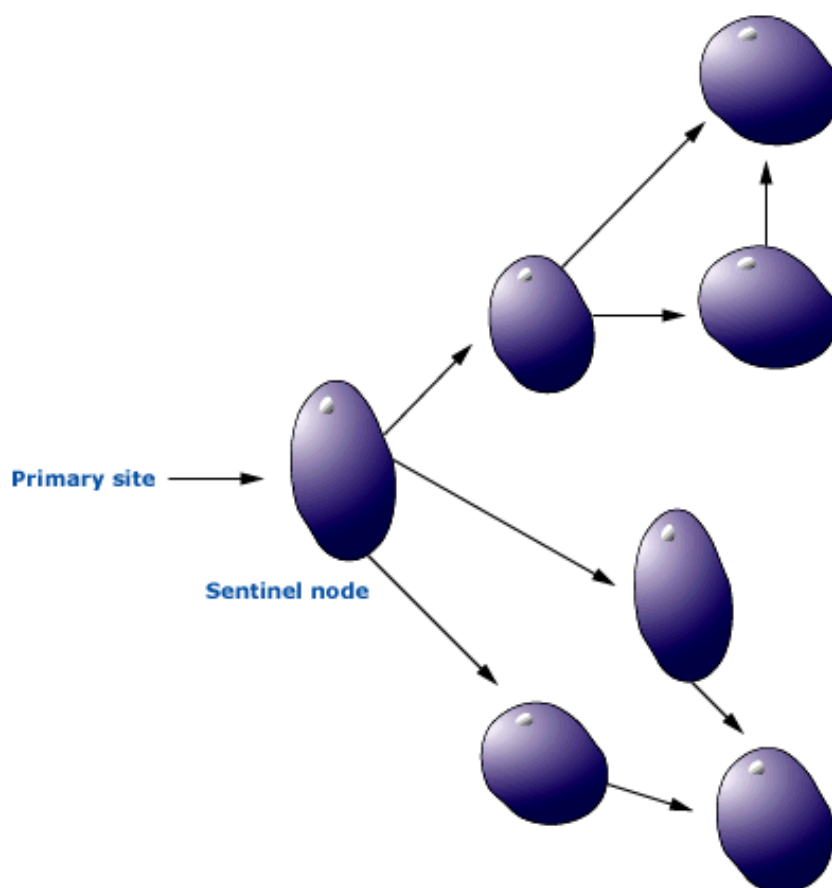
#### ***3.1.- Evolución histórica del concepto y análisis del ganglio centinela***

El sistema linfático se descubrió y discutió en la literatura científica ya en el siglo V A.C.<sup>17</sup>. La función de los ganglios linfáticos fue posteriormente estudiada por Gilchrist y Zeidman inyectando partículas inanimadas y células tumorales en el sistema linfático de animales<sup>18,19</sup>. De este modo se percataron de que la diseminación de las células neoplásicas sigue siempre un patrón similar y que los ganglios linfáticos suponen una barrera para la diseminación metastásica.

La primera “biopsia de GC” la llevó a cabo Gould en 1951 durante una parotidectomía<sup>20</sup>. Durante el acto quirúrgico observó un ganglio de características anodinas, a nivel de la unión de las venas faciales anterior y posterior, que decidió enviar para estudio intraoperatorio. La histología demostró la presencia de células tumorales y decidió realizar una linfadenectomía. Lo denominaron “ganglio centinela” y, en los siguientes 6 años, 28 pacientes con tumores parotídeos fueron sometidos a estudio de un ganglio linfático regional antes de la parotidectomía.

Sin embargo, el origen del GC posiblemente se remonte a 1948 cuando un estudiante llamado R. Randall describió un ganglio predictor de la diseminación linfática del cáncer laríngeo al que llamó “ganglio delfiano” (en honor al oráculo de Delfos)<sup>21</sup>. Posteriormente surgió la verdadera hipótesis del GC, que le

debemos al urólogo R. Cabanas, cuando describió la técnica en la diseminación inguinal del cáncer de pene en 1977<sup>22</sup>. Él puso de manifiesto la existencia de una primera estación de drenaje linfático que predecía la afectación del resto de ganglios del mismo territorio.



**Figura 3. Concepto de ganglio centinela**

Desde su descubrimiento el objetivo fue mejorar los métodos para detectarlo y examinarlo, de manera que se pudieran evitar cirugías innecesarias en aquellos casos con GC negativo debido a la escasa probabilidad de tener más ganglios afectados. De esta manera, en 1992 Morton introdujo un método para la localización intraoperatoria del GC en el melanoma maligno cutáneo, que fue el promotor de todo el desarrollo posterior de la biopsia del GC. Los resultados de Morton se presentaron en la II Conferencia Internacional de la Organización

Mundial de la Salud sobre Melanoma, siendo el punto de inflexión para la aceptación por la comunidad científica de la biopsia del GC<sup>23</sup>.

A.E. Giuliano fue el primero en introducir la biopsia del GC en pacientes con cáncer de mama en 1994 en el John Wayne Cancer Institute, donde fue capaz de identificar correctamente el status axilar en 95% de los pacientes en comparación con la LA empleando colorantes vitales<sup>24</sup>. Simultáneamente, Krag introdujo, en la Universidad de Vermont, y en colaboración con el National Cancer Institute, los trazadores isotópicos coloideos y una sonda detectora gamma quirúrgica para facilitar la biopsia del GC<sup>25</sup>, estableciendo las guías que siguen vigentes hoy en día.

Los avances en la evaluación y los conocimientos derivados del estudio del GC causaron gran revolución en la comunidad científica porque el estudio de apenas 1-4 ganglios se consideró suficiente para estadificar la situación axilar y evitar la linfadenectomía.

Los primeros estudios de GC se realizaron con una LA posterior para determinar la tasa de falsos negativos de la biopsia del GC. Esta tasa, que en los primeros trabajos se vio que era cercana al 10%, se redujo con la mayor experiencia en la realización de la técnica, con tasas de falsos negativos que en la actualidad son menores del 5%. Estos resultados eran debidos no sólo a un fallo en la realización de la técnica, sino también al estudio histológico del GC, que precisaba un protocolo y metodologías diferentes a los que se utilizaban para analizar la LA.

Los estudios randomizados de NSABP-B32 y el del Instituto Europeo de Milán donde se randomizaron pacientes con GC negativo a no hacer más cirugía axilar o a completar la cirugía con una LA, con un seguimiento de más de 8 años demostraron que en los pacientes con GC negativo no es necesaria la LA ya que los resultados oncológicos son similares y además en el grupo de GC la morbilidad es menor<sup>26,27</sup>.

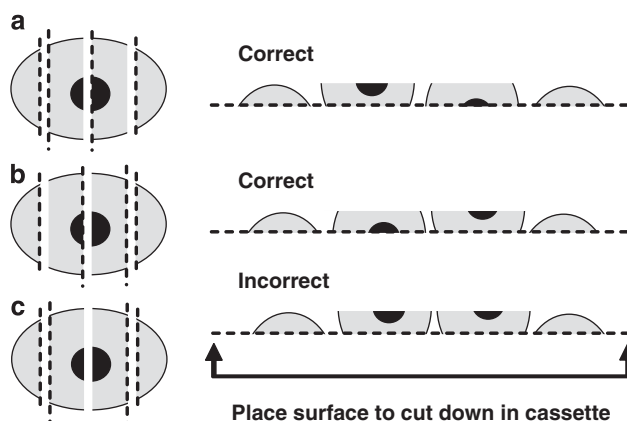
### ***3.2 Análisis del ganglio centinela***

Históricamente, el ganglio centinela se estudiaba macroscópicamente, pero el estudio microscópico demostró que existían ganglios afectados cuando parecían anodinos al examinarlos macroscópicamente. En 1971, Huvos y cols demostraron que los pacientes con metástasis inferiores a 2,0 mm tenían una supervivencia similar a aquellos con ganglios negativos<sup>28</sup>. Este concepto se incorporó al Manual para la Estadificación del Cáncer (*Manual for Staging Cancer*) y se estableció como punto de corte entre macrometástasis y micrometástasis. De esta manera el principal objetivo del patólogo era no pasar por alto ninguna metástasis mayor de 2,0 mm.

La forma de realizarlo consistía en una inspección de la grasa y el ganglio remitidos y, si cualquier dimensión era mayor de 2,0 mm, debía cortarse la muestra, normalmente siguiendo el eje mayor (que es además el sitio preferente de entrada de los vasos linfáticos al ganglio según rezan antiguas descripciones anatómicas). Este hecho, que puede parecer banal, es sin embargo el mayor avance en la evaluación patológica del GC y en la estadificación del cáncer de mama: realizar secciones inferiores a los 2 mm de grosor antes de su fijación y parafinización. Este aspecto debería tenerse en cuenta independientemente de si se está examinando un GC, una LA o cualquier tipo de ganglio linfático.

Una vez obtenidas las secciones, las dos caras opuestas resultantes deberían ser examinadas histológicamente. En caso de obtenerse tres cortes, las dos muestras correspondientes a los extremos deberían estudiarse por la superficie de corte y la muestra central de manera aleatoria, salvo que el examen macroscópico haga sospechar de alguna de las dos caras más que de la otra. Si se obtienen más de tres cortes, se tendría que evitar que las dos caras opuestas de los cortes centrales fuesen analizadas (figura 4).





**Figura 4. Procesamiento macroscópico del GC<sup>29</sup>**

### **3.3.- Papel de la inmunohistoquímica y de las secciones seriadas**

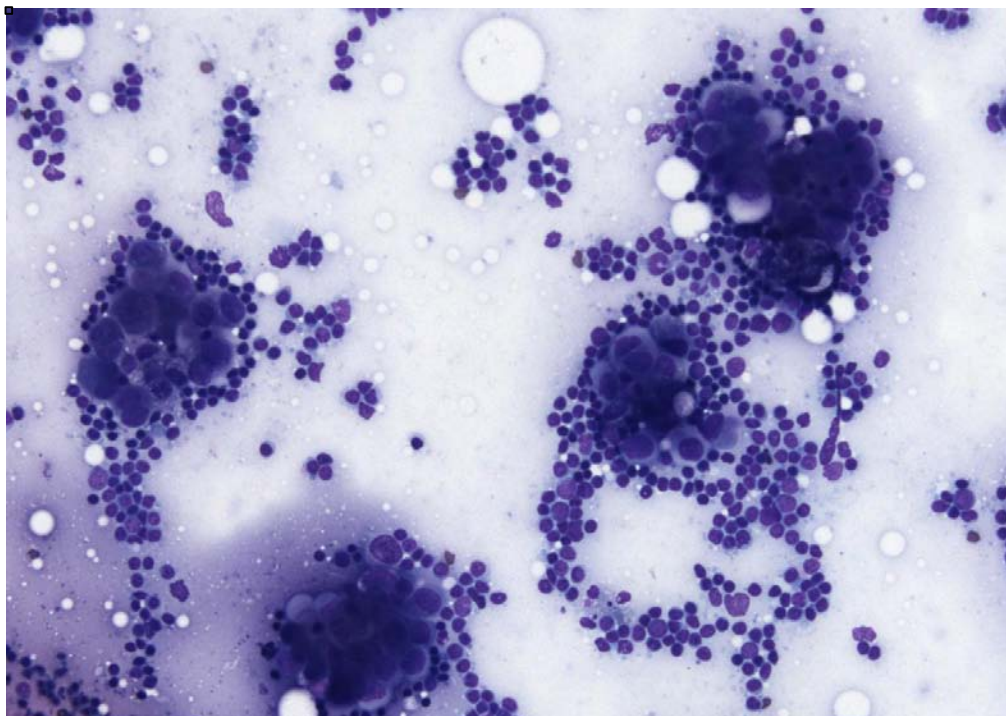
Aunque es difícil encontrar a fecha de hoy poblaciones de referencia con una supervivencia relacionada con un estudio patológico microscópico uniforme basado en cortes seriados del GC, muchos de los protocolos que existen en la actualidad se basan en múltiples secciones del ganglio y en el estudio inmunohistoquímico de citoqueratinas una vez fijadas las muestras, ya que permite detectar pequeños focos neoplásicos y células tumorales aisladas que pueden pasar desapercibidas con el simple estudio intraoperatorio o posteriormente con un único corte de hematoxilina y eosina<sup>30</sup>.

### **3.4.- Estudio intraoperatorio del ganglio centinela**

Inicialmente el análisis se hacía siempre de forma diferida, tras fijación de la muestra en formaldehído. Los primeros estudios de A.E. Giuliano, en 1995, compararon pacientes con linfadenectomías y estudio de los ganglios mediante hematoxilina y bidisección con pacientes con únicamente GC estudiado mediante corte seriado a distinta profundidad<sup>31</sup>. La frecuencia de metástasis axilares fue del 29% en el grupo de linfadenectomías y del 42% en el GC, apoyando por tanto la detección de afectación axilar (en concreto micrometástasis) mediante estudio más exhaustivo del ganglio.

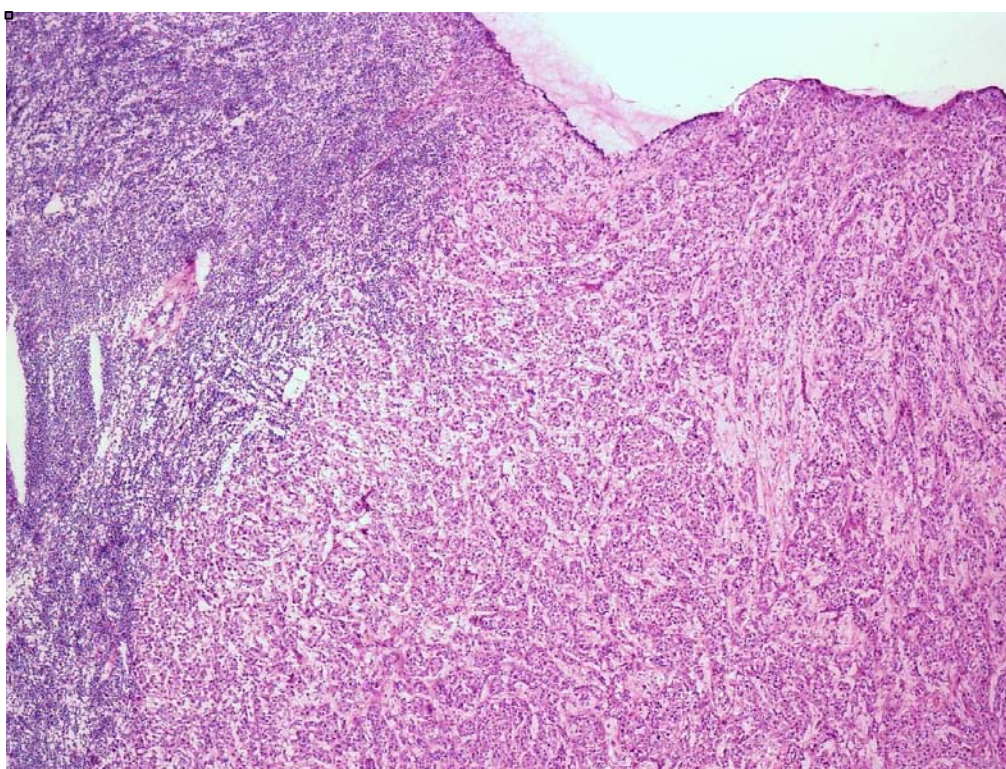
Schreiber incluyó a 210 pacientes comparando el estudio por Hematoxilina-Eosina y el estudio inmunohistoquímico, observándose un incremento de la afectación axilar tras estudio inmunohistoquímico en el 9,4% de los pacientes, reforzando la idea de que la sensibilidad de la técnica aumenta a medida que se aumenta la cantidad de material estudiado<sup>32</sup>.

Sin embargo el problema del análisis del ganglio chocó frontalmente con la realización de la técnica de forma intraoperatoria, ya que no se disponía del tiempo necesario para realizar diferentes cortes seriados o realizar tinciones complementarias, además de las dificultades implícitas al manejo de la muestra no fijada. De este modo, inicialmente se estudiaba el ganglio únicamente mediante impronta citológica, a la que posteriormente se añadió el corte en congelación. De todas maneras, aunque se consiguieron evitar linfadenectomías diferidas en aquellas pacientes con estudio intraoperatorio positivo, aún quedaba un porcentaje no despreciable de diagnósticos que se realizaban a posteriori.



*Figura 5. Metástasis ganglionar de carcinoma valorada por impronta citológica*

La publicación de la 6ª edición del TNM en 2002 supuso otro reto para el patólogo, ya que se definió el término de micrometástasis considerándose como tal la afectación ganglionar axilar inferior a 2 mm pero mayor de 0,2 mm. A su vez, aunque con un significado e implicación clínica inciertos, se habló también de células tumorales aisladas cuando los implantes eran inferiores a 0,2 mm. Ante estas nuevas definiciones, el análisis intraoperatorio del GC se fue revelando poco a poco como una herramienta suficiente para identificar las macrometástasis, aunque aún se diagnosticaba un gran número de micrometástasis en diferido.



***Figura 6. Metástasis ganglionar de carcinoma valorada por corte en congelación***

### ***3.5.- Introducción de la Biología Molecular en el análisis del ganglio centinela:***

El avance progresivo de la Biología Molecular en el campo de la Anatomía Patológica apareció entonces como una posible solución para los problemas de falta de estandarización en el análisis del ganglio centinela. Sin embargo, el

análisis molecular de las muestras requería tiempo, por lo que no se podía realizar de forma intraoperatoria. Además, el primer acercamiento se realizó con técnicas básicas como la PCR, por lo que no se podía cuantificar la afectación ganglionar, y el TNM de la 6ª y 7ª edición seguían recogiendo estos casos como pN0 (mol+).

Con el paso del tiempo las técnicas moleculares se fueron adaptando a las exigencias clínicas y aparecieron métodos cuantitativos factibles de manera intraoperatoria. De este modo surgió el Breast Lymph Node Assay (BLN), de Veridex®, que homogeneizaba la mitad de la muestra, purificaba el ARN y realizaba una reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR). Blumencranz publicó un estudio prospectivo con 416 ganglios recogidos de 12 hospitales en el que se realizaban cuatro cortes del ganglio que se estudiaban de forma alternativa por método convencional y molecular<sup>33</sup>. Los hallazgos fueron muy esperanzadores, con una concordancia del 98% para macrometástasis, del 88% para micrometástasis y una mejora general de la sensibilidad del análisis del ganglio centinela entre el 10 y el 30%. Viale presentó en 2009 un estudio de diseño y resultados similares en 293 ganglios, con una capacidad de detección de metástasis mayores de 2 mm del 98,1%, del 94,7% para afectaciones mayores de 1 mm y del 77,8% para casos mayores de 0,2 mm<sup>34</sup>. La concordancia global de la RT-PCR con la histología fue del 90,8%, con una especificidad del 95%, un valor predictivo positivo del 83,6% y un valor predictivo negativo del 92,9%. Sin embargo, todavía quedaba la mitad del ganglio linfático que se analizaba de manera convencional, por lo que aún existían casos diagnosticados de forma diferida. A día de hoy esta técnica ha dejado de ser comercializada.

De forma casi paralela, la empresa japonesa Sysmex® presentó otro método de análisis intraoperatorio (One Step Nucleic acid Amplification - OSNA® -) que mostraba una gran diferencia respecto a los métodos moleculares anteriormente descritos, y es que introducía una técnica nueva (la RT-LAMP) para la valoración cuantitativa del ARN mensajero (ARNm) de citoqueratina 19 (CK19). Este método presentaba una serie de ventajas respecto a la RT-PCR ya que era isotérmica, más rápida, no requería de la purificación del RNA y mostraba una



mayor especificidad al emplear 6 *primers* específicos. Por otro lado introducía una novedad muy importante, y es que permitía el estudio de la totalidad de la muestra de forma intraoperatoria en unos 30-35 minutos, sin reservar material para estudio convencional y diferido.



**Figura 7. Procesamiento del ganglio centinela por método OSNA (imagen izquierda). RD-100i (imagen derecha).**

Los primeros estudios de validación publicados por Tsujimoto y cols en 2007 se diseñaron de forma similar a los del BLN, realizando 4 cortes del mismo tamaño de cada ganglio y analizándolo alternativamente mediante RT-LAMP o técnica convencional<sup>35</sup>. De esta manera se estudiaron 325 ganglios (81 de ellos centinelas), obteniéndose una concordancia del 98,2% y ningún falso positivo. Visser y cols, un año después, realizó un estudio similar con 346 ganglios de 32 pacientes obteniendo una concordancia del 96,8%, sensibilidad del 95,3% y especificidad del 97,1%<sup>36</sup>. Schem, en 2009, encontró una concordancia del 91,8%, una sensibilidad del 98,1% y una especificidad del 90,8% en un análisis de 343 ganglios<sup>37</sup>. Feldman publicó una serie aún mayor de 1044 ganglios centinela de 496 pacientes procedentes de 11 centros con una sensibilidad del 82,7% y especificidad del 97,7%<sup>38</sup>.

De este modo el estudio por OSNA® permitió un diagnóstico definitivo intraoperatorio al estudiar la totalidad del ganglio y estandarizó el análisis del GC.

### **3.6.- Procesamiento del GC por OSNA**

El procesamiento de la muestra por la técnica OSNA difiere completamente del método convencional, ya sea por criocorte o por impronta citológica. Tras recibir la muestra, lo primero que se debe hacer es eliminar el tejido adiposo periganglionar, ya que dificulta el procesamiento del ganglio. Posteriormente se mide y pesa el ganglio y se realiza una sección longitudinal del mismo.

Es recomendable realizar una impronta citológica del ganglio seccionado, para disponer de muestra para la correlación morfológica. A continuación se procede a la homogenización del ganglio en su totalidad, utilizando 4ml de la solución tampón de lisis (Lynorhag- Sysmex Corporation, Kobe, Japón), con centrifugación posterior a 10000 r.p.m. El ganglio se dividirá en el número de fragmentos que sea necesario para que ninguno de ellos sobrepase los 650 mg ni sea inferior a 50 mg. Un total de 2µL del sobrenadante será introducido en el analizador RD-100i (Sysmex®), sistema automatizado de detección molecular de amplificación génica, que utiliza la tecnología RT-LAMP y el kit LynoampBC (Sysmex®).

La medición del producto amplificado se llevará a cabo mediante turbidimetría, por reacción con pirofosfato de magnesio, obteniéndose una cuantificación indirecta en tiempo real del número de copias de ARNm de CK19 obtenido. El análisis incluirá siempre un control positivo estándar y un control negativo para validación de cada test.

Dependiendo del número de copias de ARNm CK19/µL, el resultado se medirá de acuerdo con el nivel de corte establecido para la técnica<sup>35</sup>. Así se define:

- Macrometástasis (++) : > 5x10<sup>3</sup> copias/µL de ARNm CK19.
- Micrometástasis (+) : 2,5x10<sup>2</sup> - 5x10<sup>3</sup> copias/µL de ARNm CK19.
- Ausencia de metástasis (-) : <2,5x10<sup>2</sup> copias/µL de ARNm CK19.

El empleo del OSNA como método de elección para el análisis del GC se ha ido extendiendo en España hasta alcanzar más de 100 unidades instaladas a fecha de hoy.



# HIPÓTESIS





Esta tesis se plantea de acuerdo con la siguiente hipótesis: las técnicas moleculares pueden mejorar la información que aporta el GC en las pacientes con cáncer de mama.

Hasta la fecha, el número de ganglios afectados en la LA ha sido uno de los principales factores pronósticos en cáncer de mama y el número de GC afectados un valor predictivo de mayor afectación axilar. El volumen tumoral en los ganglios centinela, analizado por técnicas convencionales, se ha descrito en los últimos años como un factor independiente de afectación del resto de los ganglios axilares. Sin embargo, el estudio convencional del GC carecía de un protocolo estandarizado y reproducible, dando lugar a una gran heterogeneidad de procedimientos diferentes para su análisis. Los nuevos métodos moleculares permiten en la actualidad un diagnóstico definitivo intraoperatorio, estandarizado y automatizado, así como proporcionan un valor objetivo y reproducible, la Carga Tumoral Total (carga tumoral de ARNm de CK19), que es independiente del tipo histológico del tumor o de cualquier otra variable clínicopatológica. Si la Carga Tumoral Total en el GC analizado por técnicas moleculares predice el estado del resto de los ganglios axilares, podremos determinar el riesgo de dejar tumor residual en aquellos pacientes con GC positivo que no reciben una LA.



# OBJETIVOS



**1.- Objetivo primario:**

1) El objetivo de este trabajo es estudiar la posible relación entre la Carga Tumoral Total determinada por el método OSNA (y definida como la suma de copias de ARNm de CK19 en todos los GC positivos) y la afectación axilar.

**2.- Objetivos secundarios:**

2) Estudiar otras variables que puedan predecir la afectación axilar.

3) Construir un modelo predictivo de afectación axilar que pueda utilizarse durante el acto quirúrgico con el fin de aportar una información que ayude al cirujano a la toma de decisiones de manera intraoperatoria.

4) Elaborar un nomograma que incorpore las diferentes variables halladas con correlación estadísticamente significativa para aquellas situaciones en las que no se requiera análisis intraoperatorio.



# **PUBLICACIONES: MÉTODOS Y RESULTADOS**





**1.- METODOLOGÍA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:**

El diseño del estudio, la población del estudio y la metodología utilizada quedan descritos en los apartados “Material y métodos” de cada uno de los artículos que componen esta tesis doctoral.

Estos artículos están incluidos en las páginas siguientes, tal y como se han publicado en la literatura científica.



## 2.- TRABAJO REALIZADO: PUBLICACIONES

### 2.1.- Estudio 1:

#### **“Intraoperative molecular analysis of total tumor load in sentinel lymph node: a new predictor of axillary status in early breast cancer patients”**

*Vicente Peg, Martín Espinosa-Bravo, Begoña Vieites, Felip Vilardell, José R. Antúnez, Magdalena Sancho de Salas, Julio J. Delgado-Sánchez, Willy Pinto, Francisco Gozalbo, Anna Petit, Irene Sansano, María del Mar Téllez, Isabel T. Rubio.*

Breast Cancer Research and Treatment. 2013 May, 139(1): 87-93.

En este artículo se reflejan los resultados de un estudio multicéntrico (SOLO1113) que reclutó 697 pacientes con GC positivo analizado por OSNA y posterior LA. Se determinó la Carga Tumoral Total y se demostró su capacidad de predicción de la afectación de ganglios no centinela independientemente de otros factores.



## 2.2.- Estudio 2:

**“Nomogram including the total tumor load in the sentinel lymph nodes assessed by one-step nucleic acid amplification as a new factor for predicting non sentinel lymph node metastasis in breast cancer”**

*Isabel T. Rubio, Martín Espinosa-Bravo, Maxi Rodrigo, María Amparo Viguri Díaz, David Hardisson, Amaia Sagasta, Basilio Dueñas, Vicente Peg.*

Breast Cancer Research and Treatment. 2014 Sep, 147(2): 371-80.

Partiendo del estudio SOLO1113 que demostró la capacidad predictiva de la Carga Tumoral Total, se decidió elaborar un nomograma que incluyese el resto de variables que correlacionaron con la afectación de ganglios axilares no centinela. Para ello hubo que validar los resultados anteriores por lo que se reclutaron 436 pacientes más (procedentes de centros que no participaron en el estudio SOLO1113), siendo por lo tanto la población final estudiada de 1133 pacientes. El nomograma obtenido incluye la Carga Tumoral Total por primera vez en un modelo predictivo multivariante.



# DISCUSIÓN





Desde la introducción del concepto del GC el patólogo se ha tenido que enfrentar a una serie de retos. El principal de ellos era la necesidad de un análisis exhaustivo de la muestra que permitiera poner de manifiesto el menor depósito neoplásico en el ganglio, con el objetivo de no dejar nunca la posibilidad de enfermedad residual axilar sin reseca. Por otro lado, se pretendía que el análisis fuese lo más rápido posible, preferentemente de manera intraoperatoria, de tal forma que se pudiera realizar la linfadenectomía axilar en el mismo acto quirúrgico.

El estudio intraoperatorio presenta una serie de limitaciones respecto al análisis en diferido tras fijación en formol, lo que hace que sea más dificultoso. En primer lugar la muestra se remite fresca, por lo que procesarla resulta más complicado. Si se quiere realizar un estudio lo más rápido posible, el método más empleado era la impronta citológica, donde se obtiene material de forma casi inmediata tras realizar un corte del ganglio. Sin embargo, este procesamiento analiza una cantidad mínima del ganglio remitido y, por definición, no permitiría medir el tamaño de la metástasis ya que sólo se estudian las células desprendidas, no las que en realidad hay.

El método de elección en la gran mayoría de los departamentos de Anatomía Patológica era el corte en congelación. A pesar de que requiere más tiempo que la impronta citológica (ya que se tiene que congelar y cortar el ganglio), la muestra que se analiza se parece más a las biopsias post-fijación y permite una mejor estimación de la medida del depósito tumoral. Sin embargo, el procesamiento de la muestra hace que los cortes que se analizan no siempre sean óptimos y, debido al escaso tiempo disponible para la valoración, la cantidad de tejido estudiada es ínfima y puede dar lugar a falsos negativos que se ponen de manifiesto tras la fijación en formol.

Pero, independientemente del método empleado, uno de los principales problemas que representaba el análisis del GC era la gran diversidad y heterogeneidad de protocolos a pesar de existir guías y recomendaciones al respecto. Hasta tal punto que un estudio realizado en el año 2003 por el European Working Group for Breast Screening Pathology entre 240

departamentos europeos de Anatomía Patológica puso de manifiesto la existencia de nada menos que 123 protocolos diferentes<sup>39</sup>.

La introducción de métodos moleculares para el análisis del GC parecía la solución a este respecto. De esta manera surgió la técnica OSNA que ofrecía análisis estandarizado, reproducible y automatizado. A esto había que añadirle una importante innovación, y es que permitía, por primera vez, un diagnóstico definitivo del GC ya que se procesaba la totalidad de la muestra, por lo que dejaban de hacerse análisis en diferido. Los estudios de validación de la técnica mostraron una gran concordancia con los métodos convencionales<sup>35-38,40</sup>, por lo que se ha ido estableciendo poco a poco como técnica de elección en múltiples centros europeos.

Sin embargo, el valor clínico del GC siempre ha contado con una cierta limitación. Así como la negatividad del GC tenía una gran importancia, puesto que la probabilidad de tener más ganglios afectados era mínima, su positividad no aportaba tanta información, hasta el punto que entre el 40% y el 60% de los casos el GC era el único ganglio afectado<sup>41,42</sup>, por lo que quizás se hubiera podido omitir la disección quirúrgica del resto de ganglios.

Para intentar mejorar el valor predictivo del GC positivo, se fueron desarrollando múltiples estudios que llevaron a la elaboración de nomogramas predictivos de afectación de ganglios no centinela<sup>43-52</sup>. En ellos se tenían en cuenta toda una serie de parámetros clínico-patológicos que se asociaban con la afectación axilar, de tal forma que se incrementaba mucho el poder predictivo de la técnica. En un meta análisis realizado por el grupo holandés de Van la Parra<sup>53</sup>, en el que se revisaron los principales nomogramas publicados hasta la fecha, se vio que existían ocho grandes características clínico-patológicas que se repetían con bastante frecuencia, y que por lo tanto parecían las más asociadas con la afectación axilar. Éstas incluían: el tamaño de la metástasis del GC (>2 mm), la extensión extracapsular de la metástasis, el número de GC positivos (>1) y de GC negativos ( $\leq 1$ ), el tamaño del tumor primario (> 2cm), la proporción de GC positivos (> 50%), la presencia de permeación linfovascular y el método de detección de la metástasis.

A pesar de que la introducción de los nomogramas mejoraba el valor del GC por sí solo, existían una serie de desventajas. En primer lugar varias de las variables a tener en cuenta no se podían conocer durante el acto quirúrgico, por lo que obligaba a la toma de decisiones en diferido, no pudiendo realizar la LA durante la cirugía. Por otro lado, seguían existiendo algunos parámetros de valoración claramente objetiva y que requieren cierta experiencia, como la identificación de la permeación vascular. Por último, la introducción de métodos moleculares para el estudio del GC hace que la variable del tamaño de la metástasis tampoco pueda aplicarse, puesto que se mide en milímetros y las técnicas moleculares se basan en otro parámetro.

Por ese motivo, el estudio SOLO113 supuso un cambio radical a la hora de enfrentarse y analizar los datos obtenidos del estudio del GC por OSNA. Como ya se ha comentado, se trata de un método automatizado y estandarizado, por lo que evita la gran heterogeneidad de protocolos que existían antes. Pero, y lo que es más importante, el resultado que obtiene es el real, puesto que estudia la totalidad del ganglio remitido. Los métodos convencionales no permitían una exactitud similar ya que nunca se podía asegurar que estuviéramos viendo el mayor tamaño posible de la metástasis (quizás profundizando la muestra, según el corte realizado o en una parte desechada, el depósito fuese mayor). A su vez, el resultado del análisis del GC se basa en una unidad diferente a la anteriormente empleada (milímetros): la carga de ARNm de CK19. Este valor presenta la característica de poseer un rango tremendamente amplio, ya que la positividad va desde las 250 copias de ARNm CK19/ $\mu$ L hasta varios millones (que se han descrito en casos de macrometástasis), por lo que permite obtener mejores puntos de corte que cuando se medían en milímetros. De este modo, el valor predictivo de la TTL demostrado con el SOLO1113 ofrece, por primera vez en la historia del GC, un análisis intraoperatorio con resultado definitivo, estandarizado, reproducible y que permite conocer la probabilidad de mayor afectación axilar empleando un único parámetro.

Sin embargo, la publicación del estudio ACOSOG Z0011 por el A.E. Giuliano, realizada una vez empezado el estudio SOLO1113, pareció limitar las conclusiones del mismo<sup>54</sup>. En este estudio clínico de no inferioridad se

estudiaron dos grupos de pacientes con uno o dos GC positivos, con tumores de menos de 5 cm (T2) y con radioterapia local y quimioterapia sistémica en los que se optó por realizar LA tras conocerse la afectación del GC o no hacer nada más que el GC. Tras un seguimiento medio de 6,3 años no se vieron diferencias estadísticamente significativas tanto en la recidiva local (1,8% - GC sólo - vs 3,6% - GC + LA -), en la supervivencia global (91,9% vs 92,5%,  $p=0,024$ ) y en la supervivencia libre de enfermedad (82,2% vs 83,8%,  $p=0,13$ ), por lo que se concluyó que la LA era innecesaria en aquellas pacientes que cumplieran los criterios de inclusión del estudio.

Los resultados del ACOSOG Z0011 supusieron un cambio sustancial en el manejo de las pacientes con GC positivo y pareció que iba a cambiar radicalmente la práctica clínica en estos casos. Sin embargo, su aceptación no fue tan inmediata ni extensa como se pensaba<sup>55,56</sup>. Los motivos para mostrar cierto recelo del estudio se centraron fundamentalmente en el diseño, pero sobre todo en cómo se llevó a cabo el trabajo. Referente al primer punto, surgió la duda de si se podían aplicar las conclusiones a aquellos subgrupos de pacientes claramente infra-representados en el trabajo tales como las mujeres jóvenes, los carcinomas lobulillares infiltrantes (CLI), los tumores con receptores hormonales negativos o los HER2 positivos. En cuanto al estudio propiamente dicho, son múltiples los puntos sometidos a debate. Mirando simplemente las características clínicas de la población reclutada, llama la atención que el rango del tamaño del tumor llega hasta los 7 cm, cuando por definición no podían superarse los 5 cm. Por otro lado, y lo que es más llamativo, el 1,2% de las pacientes del brazo de la LA no tenían ningún ganglio axilar afectado y del brazo del GC 7,0%. Es decir, 8,2% de las pacientes reclutadas no presentaban afectación de ningún ganglio, incluido el GC.

Pero quizás lo que parezca restar más valor a las conclusiones sea el número de pacientes reclutadas. De un estudio cuyo tamaño muestral fue calculado en aproximadamente 1900 pacientes, apenas se reclutaron 891, menos de la mitad. Pero de éstas se perdieron 92 del brazo de la LA y 74 del GC. En resumen, se perdieron durante el seguimiento el 19,4% de las pacientes reclutadas y sólo se llegaron a estudiar al final 725.

A pesar de todo, el Z0011 ha demostrado que existe un grupo de pacientes con GC positivo en el que la cirugía no aporta ninguna ventaja, aunque parece que aún falta pulir un poco el estudio para definir más claramente cuál es este grupo. Es por esto que, en algunos centros han decidido realizar el estudio del GC en diferido para poder estudiar otros parámetros y elegir mejor aquellas pacientes que en las que se puede omitir la LA.

Las primeras publicaciones que muestran el cambio en la conducta clínica tras la publicación del Z0011 demuestran que, aunque el número de LA tras GC positivo está bajando mucho, aún hay pacientes que reciben un tratamiento quirúrgico de la axila a pesar de cumplir los criterios del Z0011. Caudle y cols publicaron los primeros datos recogidos en el MD Anderson Cancer Center de Houston (EEUU) donde vieron una reducción del 85% al 24% en las pacientes con GC positivo<sup>55</sup>. El motivo para seguir haciendo LA a pesar de cumplir los criterios del Z0011 eran el tamaño del tumor, de la metástasis ganglionar, la histología del tumor (CLI versus carcinoma ductal infiltrante (CDI)), la presencia de extensión extracapsular y, en general, el riesgo de dejar más afectación axilar.

Por este motivo vuelven a tomar fuerza los métodos predictores de afectación de ganglios axilares no centinela, en particular los nomogramas. Como ya se ha comentado anteriormente, estos presentan una serie de inconvenientes, fundamentalmente que se basan en un estudio convencional del ganglio y que, por lo tanto, siguen sometidos a todas las limitaciones que ya se han ido comentado, en particular el hecho de no estudiar la totalidad del ganglio. De hecho, uno de los parámetros con mayor correlación con la afectación de más ganglios es el tamaño de la metástasis, y por métodos convencionales no estamos nunca seguros de estar viendo la mayor dimensión de la misma (p.e. podría estar en otro plano no estudiado o la sección realizada no ser paralela al eje mayor de la metástasis).

Basándonos en los resultados del S01113, y habiendo demostrado la relevancia de la TTL como factor predictivo de afectación axilar, se elaboró un nomograma que la incorporase y que pudiera aplicarse en un segundo tiempo, cuando se pudiera contar con todas las variables que mostraron relacionarse con

la afectación axilar en nuestro estudio (la permeación linfovascular, el status de HER2, el tamaño del tumor y el número de GC afectados). De esta manera, en aquellas situaciones en que se optara por un estudio en diferido del GC debido a las características de la paciente, se podría incrementar el valor predictivo de la TTL. Sin embargo, para la publicación de dicho nomograma era imperativo validarlo y confirmarlo antes en una población diferente a la del estudio principal, por lo que se contactó con otra serie de centros que aportaron 477 pacientes más (de las cuáles 436 fueron válidas) para un tamaño muestral final de 1133 pacientes. El análisis estadístico demostró que, añadir el resto de parámetros relacionados con la afectación axilar, mejoraba el área bajo la curva (AUC) de la TTL (0,7552 vs 0,709).

Con el estudio SOLO1113 hemos demostrado que el análisis molecular del GC por OSNA no sólo permite un resultado definitivo sino que aporta un concepto nuevo, el de la TTL que permite conocer de manera intraoperatoria el riesgo de afectación de más ganglios o de forma diferida tras incorporarlo a un nomograma elaborado a partir de este mismo estudio. Este nuevo valor disponible tras el análisis molecular del GC puede resultar de gran utilidad a la hora de tomar decisiones respecto al manejo terapéutico de la axila en las pacientes con cáncer de mama y GC positivo. Además introduce un punto nuevo de reflexión al demostrar que la TTL es mejor predictor de afectación axilar que el número de GC positivos. La cantidad de tumor axilar parece por lo tanto más importante que el número de estaciones al que ha llegado y quizás se podrían evitar la LA en aquellas pacientes que no cumplen los criterios del Z0011 pero que en realidad presentan un riesgo muy bajo de afectación de más ganglios debido a su TTL.

Otro debate surge a la hora de considerar los puntos de corte establecidos para la definición de macrometástasis. Teniendo en cuenta los resultados del SOLO1113, afectaciones mayores a las 5000 copias/ $\mu$ L siguen asociándose a un riesgo muy parecido de afectación axilar, por lo que quizás se pueda ampliar el punto de corte para definir la macrometástasis. De hecho, 15000 copias/ $\mu$ L mostraron un valor predictivo negativo del 85,3%.

Nuevos estudios se están llevando a cabo para conocer si el valor de la TTL es meramente predictivo de afectación de más ganglios axilares o si es también un factor pronóstico por sí mismo, lo que quizás permitiría establecer nuevos puntos de corte que clasificaran mejor a las pacientes desde un punto de vista clínico.





# CONCLUSIONES



- 1) El estudio del GC mediante técnicas moleculares es una herramienta automatizada y estandarizada que permite dar un resultado definitivo intraoperatoriamente. La aproximación técnica y metodológica del sistema OSNA se adecúa a estos requisitos.
- 2) La Carga Tumoral Total (TTL) es un valor objetivo y reproducible que estudia la totalidad del/os GC.
- 3) La TTL correlaciona y predice la afectación de más ganglios axilares no centinela, pudiendo identificar a las pacientes sin más afectación axilar ( $p < 0,001$ ). Además su valor predictivo es mayor que el número total de GC positivos.
- 4) El uso de nomogramas permite tener en cuenta todas las características relacionadas con la afectación axilar en aquellos casos en los que el estudio del GC no se realice de manera intraoperatoria. Proponemos un nuevo nomograma que incorpora por primera vez la TTL, mejorando el valor predictivo de ésta por si sola (AUC 0,7552 vs 0,709).
- 5) La TTL puede identificar a un grupo de pacientes que, sin cumplir los criterios del Z0011, podría evitarse una LA debido al escaso riesgo de afectación de más ganglios.
- 6) Valores de TTL superiores a las 5000 copias/ $\mu\text{L}$  (p.e. 15000) siguen asociándose a un riesgo bajo de mayor afectación axilar, por lo que podrían redefinirse los puntos de corte establecidos.

- 7) Se necesitan más estudios para determinar si la TTL es un factor pronóstico en el cáncer de mama, como ya está demostrado en el caso del número de ganglios positivos por estudios convencionales.

# BIBLIOGRAFÍA



1. Vijan SS, Hamilton S, Chen B, Reynolds C, Boughey JC, Degnim AC. Intramammary lymph nodes: patterns of discovery and clinical significance. *Surgery* 2009;145:495-9.
2. Aarnio M, Sankila R, Pukkala E, et al. Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes. *Int J Cancer* 1999;81:214-8.
3. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010;127:2893-917.
4. Malvezzi M, Bertuccio P, Rosso T, et al. European cancer mortality predictions for the year 2015: does lung cancer have the highest death rate in EU women? *Ann Oncol* 2015.
5. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol* 2010;17:1471-4.
6. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000;406:747-52.
7. Feuer GA, Shevchuk M, Calanog A. Vulvar Paget's disease: the need to exclude an invasive lesion. *Gynecol Oncol* 1990;38:81-9.
8. Fisher B, Redmond C, Fisher ER, et al. Ten-year results of a randomized clinical trial comparing radical mastectomy and total mastectomy with or without radiation. *N Engl J Med* 1985;312:674-81.
9. Fisher B, Wolmark N, Bauer M, Redmond C, Gebhardt M. The accuracy of clinical nodal staging and of limited axillary dissection as a determinant of histologic nodal status in carcinoma of the breast. *Surg Gynecol Obstet* 1981;152:765-72.
10. Axelsson CK, Rank F, Blichert-Toft M, Mouridsen HT, Jensen MB. Impact of axillary dissection on staging and regional control in breast tumors < or = 10 mm--the DBCG experience. The Danish Breast Cancer Cooperative Group (DBCG), Rigshisoutalet, Copenhagen, Denmark. *Acta Oncol* 2000;39:283-9.
11. Blichert-Toft M. Axillary surgery in breast cancer management--background, incidence and extent of nodal spread, extent of surgery and accurate axillary staging, surgical procedures. *Acta Oncol* 2000;39:269-75.
12. Avril A, Le Bouëdec G, Lorimier G, et al. Phase III randomized equivalence trial of early breast cancer treatments with or without axillary clearance in post-menopausal patients results after 5 years of follow-up. *Eur J Surg Oncol* 2011;37:563-70.
13. Fisher B, Montague E, Redmond C, et al. Findings from NSABP Protocol No. B-04-comparison of radical mastectomy with alternative treatments for primary breast cancer. I. Radiation compliance and its relation to treatment outcome. *Cancer* 1980;46:1-13.
14. Orr RK. The impact of prophylactic axillary node dissection on breast cancer survival--a Bayesian meta-analysis. *Ann Surg Oncol* 1999;6:109-16.
15. Gärtner R, Jensen MB, Nielsen J, Ewertz M, Kroman N, Kehlet H. Prevalence of and factors associated with persistent pain following breast cancer surgery. *JAMA* 2009;302:1985-92.
16. Gärtner R, Jensen MB, Kronborg L, Ewertz M, Kehlet H, Kroman N. Self-reported arm-lymphedema and functional impairment after breast cancer treatment--a nationwide study of prevalence and associated factors. *Breast* 2010;19:506-15.



17. Tanis PJ, Nieweg OE, Valdes Olmos RA, Th Rutgers EJ, Kroon BB. History of sentinel node and validation of the technique. *Breast Cancer Res* 2001;3:109-12.
18. Gilchrist RK. FUNDAMENTAL FACTORS GOVERNING LYMPHATIC SPREAD OF CARCINOMA. *Ann Surg* 1940;111:630-9.
19. ZEIDMAN I, BUSS JM. Experimental studies on the spread of cancer in the lymphatic system. I. Effectiveness of the lymph node as a barrier to the passage of embolic tumor cells. *Cancer Res* 1954;14:403-5.
20. GOULD EA, WINSHIP T, PHILBIN PH, KERR HH. Observations on a "sentinel node" in cancer of the parotid. *Cancer* 1960;13:77-8.
21. Alex JC, Krag DN, Harlow SP, et al. Localization of regional lymph nodes in melanomas of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1998;124:135-40.
22. Cabanas RM. An approach for the treatment of penile carcinoma. *Cancer* 1977;39:456-66.
23. Morton DL, Wen DR, Wong JH, et al. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg* 1992;127:392-9.
24. Giuliano AE, Kirgan DM, Guenther JM, Morton DL. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. *Ann Surg* 1994;220:391-8; discussion 8-401.
25. 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;2:335-9; discussion 40.
26. Krag DN, Anderson SJ, Julian TB, et al. Sentinel-lymph-node resection compared with conventional axillary-lymph-node dissection in clinically node-negative patients with breast cancer: overall survival findings from the NSABP B-32 randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2010;11:927-33.
27. Veronesi U, Paganelli G, Viale G, et al. Sentinel-lymph-node biopsy as a staging procedure in breast cancer: update of a randomised controlled study. *Lancet Oncol* 2006;7:983-90.
28. Huvos AG, Hutter RV, Berg JW. Significance of axillary macrometastases and micrometastases in mammary cancer. *Ann Surg* 1971;173:44-6.
29. Weaver DL. Pathology evaluation of sentinel lymph nodes in breast cancer: protocol recommendations and rationale. *Mod Pathol* 2010;23 Suppl 2:S26-32.
30. Nährig J, Richter T, Kowolik J, et al. Comparison of different histopathological methods for the examination of sentinel lymph nodes in breast cancer. *Anticancer Res* 2000;20:2209-12.
31. Giuliano AE, Dale PS, Turner RR, Morton DL, Evans SW, Krasne DL. Improved axillary staging of breast cancer with sentinel lymphadenectomy. *Ann Surg* 1995;222:394-9.
32. Schreiber RH, Pendas S, Ku NN, et al. Microstaging of breast cancer patients using cytokeratin staining of the sentinel lymph node. *Ann Surg Oncol* 1999;6:95-101.
33. Blumencranz P, Whitworth PW, Deck K, et al. Scientific Impact Recognition Award. Sentinel node staging for breast cancer: intraoperative molecular pathology overcomes conventional histologic sampling errors. *Am J Surg* 2007;194:426-32.

34. Viale G, Dell'Orto P, Biasi MO, et al. Comparative evaluation of an extensive histopathologic examination and a real-time reverse-transcription-polymerase chain reaction assay for mammaglobin and cytokeratin 19 on axillary sentinel lymph nodes of breast carcinoma patients. *Ann Surg* 2008;247:136-42.
35. Tsujimoto M, Nakabayashi K, Yoshidome K, et al. One-step nucleic acid amplification for intraoperative detection of lymph node metastasis in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2007;13:4807-16.
36. Visser M, Jiwa M, Horstman A, et al. Intra-operative rapid diagnostic method based on CK19 mRNA expression for the detection of lymph node metastases in breast cancer. *Int J Cancer* 2008;122:2562-7.
37. Schem C, Maass N, Bauerschlag DO, et al. One-step nucleic acid amplification-a molecular method for the detection of lymph node metastases in breast cancer patients; results of the German study group. *Virchows Arch* 2009;454:203-10.
38. Feldman S, Krishnamurthy S, Gillanders W, et al. A novel automated assay for the rapid identification of metastatic breast carcinoma in sentinel lymph nodes. *Cancer* 2011;117:2599-607.
39. Cserni G, Amendoeira I, Apostolikas N, et al. Discrepancies in current practice of pathological evaluation of sentinel lymph nodes in breast cancer. Results of a questionnaire based survey by the European Working Group for Breast Screening Pathology. *J Clin Pathol* 2004;57:695-701.
40. Tamaki Y, Akiyama F, Iwase T, 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;15:2879-84.
41. Abdessalam SF, Zervos EE, Prasad M, et al. Predictors of positive axillary lymph nodes after sentinel lymph node biopsy in breast cancer. *Am J Surg* 2001;182:316-20.
42. Albertini JJ, Lyman GH, Cox C, et al. Lymphatic mapping and sentinel node biopsy in the patient with breast cancer. *Jama* 1996;276:1818-22.
43. Cho J, Han W, Lee JW, et al. A scoring system to predict nonsentinel lymph node status in breast cancer patients with metastatic sentinel lymph nodes: a comparison with other scoring systems. *Ann Surg Oncol* 2008;15:2278-86.
44. Cripe MH, Beran LC, Liang WC, Sickle-Santanello BJ. The likelihood of additional nodal disease following a positive sentinel lymph node biopsy in breast cancer patients: validation of a nomogram. *Am J Surg* 2006;192:484-7.
45. Cserni G. Sentinel lymph-node biopsy-based prediction of further breast cancer metastases in the axilla. *Eur J Surg Oncol* 2001;27:532-8.
46. Dauphine CE, Haukoos JS, Vargas MP, Isaac NM, Khalkhali I, Vargas HI. Evaluation of three scoring systems predicting non sentinel node metastasis in breast cancer patients with a positive sentinel node biopsy. *Ann Surg Oncol* 2007;14:1014-9.
47. Degnim AC, Reynolds C, Pantvaidya G, et al. Nonsentinel node metastasis in breast cancer patients: assessment of an existing and a new predictive nomogram. *Am J Surg* 2005;190:543-50.
48. Klar M, Jochmann A, Foeldi M, et al. The MSKCC nomogram for prediction the likelihood of non-sentinel node involvement in a German breast cancer population. *Breast Cancer Res Treat* 2008;112:523-31.

49. Coutant C, Rouzier R, Fondrinier E, et al. Validation of the Tenon breast cancer score for predicting non-sentinel lymph node status in breast cancer patients with sentinel lymph node metastasis: a prospective multicenter study. *Breast Cancer Res Treat* 2009;113:537-43.
50. Meretoja TJ, Leidenius MH, Heikkilä PS, et al. International Multicenter Tool to Predict the Risk of Nonsentinel Node Metastases in Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst* 2012.
51. Meretoja TJ, Audisio RA, Heikkilä PS, et al. International multicenter tool to predict the risk of four or more tumor-positive axillary lymph nodes in breast cancer patients with sentinel node macrometastases. *Breast Cancer Res Treat* 2013;138:817-27.
52. Changsri C, Prakash S, Sandweiss L, Bose S. Prediction of additional axillary metastasis of breast cancer following sentinel lymph node surgery. *Breast J* 2004;10:392-7.
53. van la Parra RF, Peer PG, Ernst MF, Bosscha K. Meta-analysis of predictive factors for non-sentinel lymph node metastases in breast cancer patients with a positive SLN. *Eur J Surg Oncol* 2011;37:290-9.
54. Giuliano AE, Hunt KK, Ballman KV, et al. Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis: a randomized clinical trial. *Jama* 2011;305:569-75.
55. Caudle AS, Hunt KK, Tucker SL, et al. American College of Surgeons Oncology Group (ACOSOG) Z0011: Impact on Surgeon Practice Patterns. *Ann Surg Oncol* 2012;19:3144-51.
56. Massimino KP, Hessman CJ, Ellis MC, Naik AM, Vetto JT. Impact of American College of Surgeons Oncology Group Z0011 and National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-32 trial results on surgeon practice in the Pacific Northwest. *Am J Surg* 2012;203:618-22.

# **AGRADECIMIENTOS**



Llegados a este punto, me gustaría acabar agradeciendo a toda la gente que ha hecho posible este trabajo. Deberían haber figurado al principio del mismo, porque estaban allí antes de empezarlo, pero por temas estructurales toca hacerlo en las últimas páginas.

En primer lugar tengo que agradecer la labor de mis directores, que me han marcado el camino. A Santiago, por abrirme las puertas de la Patología Mamaria y por su cariño y apoyo no sólo en este proyecto de investigación sino en el día a día. A Isabel, por creer en esta idea, por su exigencia, por su rigor y por emprender nuevos trabajos que siguen con este concepto. A Josep, por enseñarme que las proteínas celulares son algo más que letras y números impronunciables y por tratar de contagiarme su entusiasmo por las mismas.

Al Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Vall d'Hebron, con quien convivo cada día. En especial a "mi quinta", la savia nueva que está siempre a mi lado compartiendo vivencias, preocupaciones e ilusiones: Irene, Maru, Mayte y Sandra. A Josep, por su gran compañerismo y por saber que puedo contar siempre con él, porque nunca protesta cuando necesitas ayuda. A Berta, por enseñarme tanto con su manera de ser y trabajar. A Marga, por contagiarme su entusiasmo y optimismo. A Natalia y Helena, por confiar en mi y apoyarme. A Joan Carles, por escuchar y comprender mis inquietudes. A Paco, Noe, Miriam, Susana y demás técnicos que me han permitido llevar a cabo este trabajo al aceptar el desafío que supuso el OSNA para ellos. Y a los residentes, porque asumen gran parte del trabajo que me tocaría hacer y porque me siento cercano a ellos, no hace tanto tiempo que formaba parte de ese grupo...

A la fantástica Unidad de Patología Mamaria del Hospital Vall d'Hebron, porque trabajar con ellos es muy fácil. En especial a Martín, que es el otro brazo de la Carga Tumoral. A Octavi, Tomás, Roberto y Antonio, por su paciencia, amistad y compañerismo. A los oncólogos porque, a pesar de exigir mucho, dan más y se aprende de ellos sin querer. A Josito y al gran doctor Cortés, porque resolvéis mil dudas que me surgen y me permitís seguir avanzando, y por vuestra amistad. A Nacho, Rafa y Óscar, porque en el fondo son patólogos "en blanco y negro", y me

entienden. A Manel, por sus consejos, y a pesar de sus intentos de reemplazar al patólogo por aplicaciones electrónicas.

A Cristina, que es la otra directora de la tesis, pero en la sombra. Por animarme continuamente, compartir mis inquietudes y "FISHes" y por contagiarme su ilusión por cualquier proyecto de investigación. A Teresa y Rosa, porque son el engranaje que hacen que todo funcione en el Laboratorio.

A todo el equipo de Sysmex, en especial a Lluisa y a Ferrán, porque creyeron en esta idea, la apoyaron y no pusieron ninguna pega aunque no estaba muy claro donde nos llevaba. Y gracias ahora por seguir defendiéndola.

A Laia y a Rafa, por "adoptarme" y cuidarme.

A Albert y Salvador, de Saalig. Nunca apreciaré la estadística como vosotros por mucho que os esforcéis, pero vuestra magia con los números nos hacen saber que lo que vemos es real.

A todos los compañeros patólogos que aceptaron participar en el proyecto. Porque sé que no les sobra precisamente tiempo, pero aún así decidieron dedicar una parte del mismo a colaborar con nosotros. Sin ellos hubiese sido imposible. Y a todas las pacientes que han sido incluidas en el proyecto, porque contribuyen a que intentemos aprender y saber más sobre esta enfermedad.

Y por supuesto a mi familia, que es el sentido de todo. A mis padres y hermanos, que han sido demasiado insistentes, pero sin ellos no hubiese seguido con esto y por estar siempre conmigo. A mi tía Maritere, que ha sido más insistente aún si cabe. A mis abuelos, que sé que estarían orgullosos. Y a Guille, Hugo y Elena, que simplemente lo sois todo. A vosotros no sólo quiero daros las gracias, sino pedir os perdón por dedicar en muchas ocasiones más tiempo al trabajo del que merece. Espero corregirlo y que lo entendáis.

Espero no dejarme a mucha gente, aunque seguro que habrá más de uno... No os lo toméis mal, sabéis que también os estoy muy agradecido aunque se me haya pasado citar os aquí.

