

## **Ganglio centinela en cáncer de mama: algunas respuestas a preguntas que se plantean en la práctica diaria.**

David Hardisson  
Dpto. de Anatomía Patológica  
Hospital Universitario La Paz, Madrid  
[dhardisson.hulp@salud.madrid.org](mailto:dhardisson.hulp@salud.madrid.org)

La presencia o ausencia de metástasis en los ganglios linfáticos regionales es un dato fundamental en el sistema de estadificación TNM y es el indicador pronóstico más importante en el cáncer de mama. Sin embargo, la linfadenectomía axilar tiene una importante morbilidad, que incluye limitación en la movilidad del brazo, pérdida de sensibilidad y edema de la extremidad. Para tratar de disminuir estos efectos indeseables sin perder información importante se ha desarrollado la técnica de la biopsia del denominado ganglio centinela (GC), que en los últimos años se ha convertido en uno de los avances más importantes en la cirugía del cáncer de mama. Para que la técnica sea efectiva, es necesario que los cirujanos sean capaces de identificar y diseccionar el GC y los patólogos deben examinarlo cuidadosa y sistemáticamente. Los clínicos, patólogos y pacientes deben entender el significado de identificar metástasis en el GC y también de que existe un riesgo de que el resultado de la evaluación del GC sea un falso-negativo. Los patólogos debemos dar información no sólo sobre la existencia o no de metástasis en el GC sino también acerca del tamaño de la metástasis. A medida que se va profundizando en el conocimiento del GC esta información es cada vez de mayor importancia.

En esta breve revisión vamos a tratar de responder a una serie de interrogantes que se plantean a la hora de procesar y analizar el GC en la rutina clínica.

### ¿Cómo debe examinarse microscópicamente el GC?

Debe diseccionarse cuidadosamente el tejido fibroadiposo para identificar el GC. El GC debe medirse y tallarse siguiendo el eje mayor en secciones de hasta 2 mm si el ganglio linfático tiene un grosor superior a los 5 mm (los ganglios de menor grosor se procesan enteros). Cada GC identificado debe incluirse en una cápsula separada. Todas las secciones obtenidas deben estudiarse a continuación.

### Protocolos de detección de micrometástasis en el estudio del ganglio centinela ¿es lo óptimo enemigo de lo bueno?

Desde hace más de medio siglo sabemos que algunos de los ganglios linfáticos clasificados como “negativos” contendrán metástasis “ocultas”. Más recientemente, algunos estudios han demostrado una menor supervivencia o un aumento del riesgo de recaída cuando se demuestra la presencia de depósitos metastásicos al realizar cortes seriados del ganglio linfático o al utilizar sistemáticamente técnicas de inmunohistoquímica; sin embargo, otros estudios no han llegado a esta conclusión por lo que en la actualidad el

potencial biológico de las denominadas células tumorales aisladas es objeto de controversia. La mayoría de los patólogos coincide en que el estudio seriado exhaustivo de los ganglios linfáticos procedentes de las disecciones axilares es inviable por su elevado costo y tiempo necesario para completar el análisis. Una de las principales ventajas que ofrece al patólogo la técnica del GC es la de reducir el número de ganglios linfáticos que deben examinarse. El número medio de GC que se obtienen en cada caso es de 1,5-2. En la mayoría de los estudios la utilización de la inmunohistoquímica (citoqueratinas) aumenta la detección de metástasis en el GC en torno al 10-12%. Si se realiza un estudio seriado exhaustivo del GC complementado con el uso de técnicas especiales, se estima que esta cifra aumenta hasta el 25-30%. En este sentido, algunos autores insisten en que es importante detectar hasta una única célula tumoral en el GC.

Todo lo anterior nos lleva a plantearnos cuál es el mejor protocolo de estudio del GC. Si deseamos estar seguros de que vamos a poder detectar todas las células tumorales individuales en el GC deberemos realizar secciones seriadas a intervalos de 10  $\mu\text{m}$  (0,01 mm) y utilizar técnicas de inmunohistoquímica. Para dar una idea de lo que representa esto, vamos a analizar algunas cifras: en un estudio realizado en la Universidad de Vermont (EE.UU.) se estima que el coste de una técnica de inmunohistoquímica es de aproximadamente 12 \$. Con dos GC por caso y una media de 200 secciones por bloque, el coste sería de 4800\$/caso, asumiendo que los GC fueran cortados a intervalos de 2 mm en el examen macroscópico, como se ha indicado previamente. Si todos los nuevos casos de cáncer de mama con ganglios linfáticos negativos clínicamente en EE.UU. fueran examinados de acuerdo a este protocolo, el coste global sería de más de 690 millones de dólares y supondría el estudio de alrededor de 57 millones de preparaciones (Weaver, 2003). En este contexto, deberían tenerse en cuenta, además, los errores de interpretación, que se incrementan al aumentar el número de preparaciones que hay que examinar. Se estima que la tasa de metástasis ocultas (macro o micrometástasis) oscila entre el 2-9% en los ganglios linfáticos axilares. En un estudio multicéntrico sobre GC coordinado por la Universidad de Vermont, la tasa de de metástasis ocultas detectadas al revisar las preparaciones originales fue del 2,6% (Weaver et al, 2000).

Una aproximación menos drástica es la que sugieren los expertos del Instituto Europeo de Oncología de Milán (Viale et al, 2006). Estos autores proponen la seriación completa del GC en congelación a intervalos de 50-100  $\mu\text{m}$  y el examen de todas las preparaciones con el objetivo de gran aumento (100x). Sólo se realizan técnicas de inmunohistoquímica en casos de duda en los que se considera necesario confirmar la naturaleza metastásica de células morfológicamente atípicas (aproximadamente, el 5% de los casos). De acuerdo a este protocolo se obtienen aproximadamente 60 secciones de cada GC de 0,5 cm de grosor, que se pueden examinar en unos 45 minutos. Obviamente, estos autores son conscientes de que este protocolo que exige el estudio completo del GC no es aplicable en todos los laboratorios.

Una reciente revisión de los protocolos seguidos en Europa en la evaluación del GC ha mostrado diferencias relevantes entre los 240

laboratorios que respondieron al cuestionario planteado. Alrededor del 12% de los laboratorios examinan únicamente un nivel en el ganglio centinela, mientras que el resto de laboratorios realizan un estudio seriado del GC, con un número de niveles que va de 2-5 hasta más de 100 separados a intervalos de 40  $\mu\text{m}$  (Cserni et al, 2004).

En definitiva, la identificación de absolutamente todas las posibles células metastásicas en un GC es un esfuerzo colosal y absolutamente desproporcionado que nos lleva al aforismo clásico de que lo mejor es enemigo de lo bueno. Pero entonces ¿dónde situamos el término medio? Ante todo, debemos decidir cuál es el tamaño mínimo de la metástasis que queremos identificar para decidir las estrategias de seriación del GC. Con este planteamiento asumimos que la detección de metástasis de menor tamaño al establecido será un hallazgo casual debido al azar. En base a los datos de los que disponemos actualmente, el requisito mínimo que debemos plantearnos en el examen del GC es la detección de las macrometástasis. Si podemos descubrir todas las metástasis = 2 mm la cifra teórica de metástasis perdidas en el estudio histológico no superará el 2% (Farshid et al, 2000). Por tanto, la siguiente cuestión que debemos abordar es:

#### ¿Cuánto seriar?

La mayoría de las macro y micrometástasis que se encuentran en los GC son identificables en los cortes de tejido teñidos con H&E (Fitzgibbons et al, 2000; Association of Directors of Anatomic and Surgical Pathology, 2001). **La seriación del bloque a intervalos de 200 a 500  $\mu\text{m}$  (nivel inicial más una o dos secciones adicionales, con un máximo de 6 niveles en todo caso) incrementa la detección de micrometástasis ya que permite el análisis más exhaustivo de la zona correspondiente al seno capsular, que es la zona donde se detectan la mayoría de las metástasis.** Algunos autores defienden que es mejor **realizar el estudio seriado del GC tras la fijación en formol e inclusión en parafina con el fin de minimizar los artefactos que se producen en el estudio en congelación y que pueden comprometer la integridad de la cápsula** en los laboratorios en los que se realiza el estudio del GC en biopsia intraoperatoria (Kuehn et al, 2005). Si el GC ha sido tallado como se ha indicado previamente, prácticamente todas las macrometástasis (> 2 mm) y la mayoría de las micrometástasis (>0,2-2,0 mm) serán detectadas en el estudio convencional con H&E. En algunos casos, también se podrá detectar la presencia de células tumorales aisladas (CTA) y pequeñas agrupaciones de células tumorales ( $\approx$  0,2 mm). **Las evidencias científicas disponibles a día de hoy, basadas en la relevancia pronóstica de la afectación del GC por células tumorales aisladas, no justifican una búsqueda sistemática exhaustiva de todas micrometástasis en el GC** (Kuehn et al, 2005).

#### Biopsia intraoperatoria vs examen diferido del GC.

En función de los protocolos y documentos de consenso disponibles actualmente, tanto el examen del GC en biopsia intraoperatoria como diferido tras la fijación en formol e inclusión en parafina son válidos y cada laboratorio deberá elegir entre ambos dependiendo de sus circunstancias concretas

(disponibilidad de criostato, personal técnico suficiente, experiencia del patólogo...).

El estudio en congelación tiene la ventaja de que permite la realización de la disección axilar en el mismo acto quirúrgico en el caso de que se demuestre la existencia de metástasis en el GC. En este contexto, es esencial tener una idea clara de las ventajas e inconvenientes que tiene el examen intraoperatorio del GC. El estudio intraoperatorio puede comprender únicamente el examen macroscópico, citológico o mediante corte en congelación o una combinación de los anteriores. El corte en congelación tiene el riesgo de artefactar el tejido y complicar el estudio del ganglio notablemente, comprometiendo especialmente la valoración de la zona subcapsular y el posterior estudio del tejido fijado en formol e incluido en parafina. Como se ha indicado previamente, ***algunos documentos de consenso no recomiendan la realización de cortes seriados a diferentes niveles en la evaluación intraoperatoria del GC*** (Kuehn et al, 2005).

#### Inmunohistoquímica: ¿sí o no?

El estudio del GC mediante técnicas de inmunohistoquímica puede incrementar la detección de CTA y pequeños grupos de células tumorales. El uso de anticuerpos frente a citoqueratinas puede ser útil en el caso del carcinoma lobulillar ya que en variedad histológica las células tumorales se pueden parecer mucho a los linfocitos del ganglio linfático. Sin embargo, debemos tener en cuenta que el uso de técnicas de inmunohistoquímica no garantiza la detección de las células metastásicas en todos los casos. Así, un estudio realizado en la Universidad de Vermont revisando mediante técnicas de análisis automático de imagen las preparaciones teñidas con citoqueratinas e informadas como negativas en el estudio con microscopía convencional demostró la presencia de células tumorales aisladas o grupos de células tumorales de hasta 30 µm de diámetro máximo en el 10,5% de los casos (Weaver et al, 2002). La evaluación completa de un GC seriado a intervalos de 10 µm con análisis de imagen tarda unas 100 horas de escaneo seguido de una revisión de las imágenes sospechosas por un patólogo entrenado para determinar si se trata de una metástasis o no, lo que hace que este abordaje sea inviable en la práctica diaria.

Para decidir si la inmunohistoquímica es importante en la evaluación del GC es importante considerar la relevancia clínica y la importancia biológica de la demostración micrometástasis mediante el empleo de citoqueratinas. Algunos estudios han demostrado que la presencia de micrometástasis en el GC tiene un efecto adverso sobre la supervivencia de la paciente, mientras que otros no han podido confirmar estos datos (revisado en Lyman et al, 2005). Pero la definición de micrometástasis en los diferentes estudios ha sido variable y el método de detección diferente, desde la simple H&E hasta la RT-PCR, pasando por la IHQ en la mayoría de los casos.

En el año 2001 se publicaron los datos correspondientes a una serie de 696 pacientes con cáncer de mama estudiadas en el John Wayne Cancer Center que fueron seguidas una media de 38 meses; el único grupo de

pacientes con una disminución en el intervalo libre de enfermedad y en la supervivencia global fue el de los casos con metástasis en los ganglios linfáticos > 2 mm (macrometástasis). El intervalo libre de enfermedad para las pacientes con ganglios linfáticos negativos en el estudio combinado con H&E e inmunohistoquímica fue del 95,1% frente al 98,3% para las pacientes con ganglios linfáticos negativos en el estudio con H&E pero con demostración de células tumorales mediante inmunohistoquímica. Los autores de este trabajo concluyen que las metástasis descubiertas únicamente con técnicas de inmunohistoquímica no parecen afectar negativamente al pronóstico y, en base a estos hallazgos, **la inmunohistoquímica no debe ser incorporada rutinariamente al estudio del GC** (Hansen et al, 2001). Estas recomendaciones coinciden con las propuestas por diferentes paneles de expertos (Nacional Comprehensive Cancer Network, NCCN, College of American Pathologist, CAP, Comité de consenso de la Sociedad Alemana de Senología y ASCO) que no recomiendan la utilización rutinaria de la inmunohistoquímica en la evaluación del GC. En todo caso, los resultados deben informarse de acuerdo a los protocolos establecidos para la estadificación del cáncer de mama (UICC/AJCC):

#### Informe anatomopatológico del GC.

**El patólogo debe proporcionar información suficiente en su informe para poder establecer de un modo preciso la estadificación del tumor de acuerdo al último protocolo TNM (UICC/AJCC) del año 2002** (Sobin LH y Wittekind C, 2002). Así, si hay algún foco metastático supera los 2 mm de diámetro, el número total de ganglios linfáticos positivos determina la categoría pN. El resto de categorías se definen de la siguiente forma:

- ✍ Micrometástasis (pN1mi): agregados de células tumorales cuyo tamaño es > 0,2 mm pero menor de 2 mm.
- ✍ Células tumorales aisladas (pN0): células o grupo de células tumorales de tamaño = 0,2 mm se le clasifica como “células tumorales aisladas”, independientemente del método de detección empleado.
- ✍ Se puede establecer una subclasificación del estadio pN0 cuando se utilizan técnicas especiales:
  - ✍ pN0 (i-): cuando se realizan técnicas de inmunohistoquímica y éstas resultan negativas.
  - ✍ pN0 (i+): células tumorales positivas con técnicas de inmunohistoquímica pero n grupos menores de 0,2 mm.
  - ✍ pN0 (mol-): sin evidencia histológica de metástasis y RT-PCR negativa.
  - ✍ pN0 (mol+): sin evidencia histológica de metástasis pero RT-PCR positiva.

Si la estadificación se basa únicamente en los hallazgos encontrados en el ganglio centinela, debe añadirse (sn) a la clasificación [p.e., pN0 (i+)(sn)].

¿Qué recomendar al cirujano cuándo en el GC encontramos células tumorales aisladas o grupos de células < 0,2 mm? Utilidad de los modelos predictivos.

Se estima que cuando el GC contiene células tumorales aisladas o metástasis de un tamaño inferior a 1 mm, la probabilidad de que haya metástasis en el resto de los ganglios linfáticos axilares es de alrededor del 16%; sin embargo, cuando las metástasis en el GC son >1 mm pero no superiores a 2 mm la probabilidad de encontrar metástasis en los ganglios linfáticos axilares sube hasta el 36% (Viale et al, 2001). El poder predecir qué pacientes con GC positivo son los que van a presentar metástasis en el resto de los ganglios linfáticos axilares resultaría de gran utilidad para decidir la estrategia terapéutica en cada caso. En base a los resultados de los análisis multivariantes publicados hasta la fecha, hay tres factores que han demostrado estar asociados con una mayor probabilidad de encontrar metástasis en el resto de los ganglios linfáticos axilares: tamaño de la micrometástasis en el GC (detectada únicamente mediante IHQ, micrometástasis [ $>0,2 = 2,0$  mm] o macrometástasis), tamaño del tumor primario y presencia de invasión vascular linfática (Lyman et al, 2005). La combinación de estos tres parámetros permite establecer un modelo que ayuda a predecir la probabilidad de encontrar metástasis en los ganglios linfáticos axilares en el caso de que el GC sea positivo. En esta misma línea, Van Zee y cols (Van Zee et al, 2003) han creado un modelo multivariante para tratar de predecir la probabilidad de metástasis en los GL axilares basado en 9 variables a partir del análisis de 702 pacientes con GC positivo y con posterior disección axilar. Este nomograma ha sido validado prospectivamente en una serie posterior de 373 pacientes y está disponible en la página Web del Memorial Sloan Kettering Cancer Center ([www.mskcc.org](http://www.mskcc.org)).

Hasta que se disponga de más datos, el panel de expertos de la ASCO y otros autores con gran experiencia en la técnica del ganglio centinela en el cáncer de mama, como los del Instituto Europeo de Oncología, recomiendan la realización de la **linfadenectomía axilar en los casos en que se encuentren micrometástasis en el GC ( $>0,2$  mm  $= 2$  mm), independientemente del método de detección**. En el caso de las células tumorales aisladas, creemos que la decisión final de qué hacer en cada caso individual deberá discutirse en equipo (patólogo, cirujano, oncólogo, radioterapeuta...) informando claramente a la paciente de los argumentos a favor y en contra de realizar la linfadenectomía axilar.

Consideraciones finales.

De acuerdo a los protocolos y documentos de consenso establecidos por diferentes expertos para el estudio del GC y teniendo en cuenta las circunstancias particulares de nuestro laboratorio, nosotros proponemos las siguientes recomendaciones para el estudio del ganglio centinela en la práctica clínica:

1. Deben estudiarse todos los GC remitidos por el cirujano.

2. **Tallado del GC:** el GC es tallado en secciones de aproximadamente 2 mm de espesor siguiendo el eje mayor. Si el grosor del GC es inferior a 5 mm se incluye completamente sin realizar cortes seriados.
3. **Biopsia intraoperatoria (corte en congelación)** [como alternativa o complemento se puede realizar impronta o frotis citológicos]: examen de la sección inicial de cada rodaja de tejido obtenido de la seriación macroscópica del GC con tinción de H&E.
4. **Estudio diferido:** estudio seriado del GC a intervalos de 200-500 µm (0,2-0,5 mm) con tinción de H&E (número de niveles recomendados: entre 2-6, dependiendo del intervalo de corte).
5. **Inmunohistoquímica:** no se realiza de rutina. Sólo se emplea en casos dudosos.
6. **Definición de micrometástasis y CTA. Informe anatomopatológico:** clasificación TNM.

Para tratar de unificar los protocolos de estudio del GC sería recomendable la elaboración de un documento de consenso por parte del Club de Patología Mamaria de la SEAP de tal forma que todos los Servicios de Anatomía Patológica dispusieran de un protocolo común. Esto permitiría que los resultados obtenidos del examen del GC fuesen reproducibles posibilitando el establecimiento en el futuro de conclusiones acerca de los aspectos más polémicos de esta técnica, especialmente los referidos a la relevancia clínica y la importancia biológica de las células tumorales aisladas.

#### Referencias.

- ✍ Association of Directors of Anatomic and Surgical Pathology: Recommendations for processing and reporting of lymph node specimens submitted for evaluation of metastatic disease. *Am J Clin Pathol* 2001;115:799-801.
- ✍ College of American Pathologists ([www.cap.org](http://www.cap.org)).
- ✍ Cserni G, Amendoeira I, Apostolakis N, et al. Discrepancies in current practice of pathologic evaluation of sentinel lymph nodes in breast cancer. Results of a questionnaire based survey by the European Working Group for Breast Cancer Screening Pathology. *J Clin Pathol* 2004;57:695-701.
- ✍ Farshid G, Pradhan M, Kollias J, Gill PG. Computer simulations of lymph node metastasis for optimizing the pathologic examination of sentinel lymph nodes in patients with breast carcinoma. *Cancer* 2000;89:2527-37.
- ✍ Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver DL, et al. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124:966-78.
- ✍ Hansen NM, Grube BJ, Te W, et al. Clinical significance of axillary micrometastases in breast cancer: how small is too small? [Abstract 91]. *Proc ASCO* 2001;20:249.
- ✍ Kuehn T, Bembenek A, Decaer T, et al. A concept for the clinical implementation of sentinel node biopsy in patients with breast carcinoma with special regard to quality assurance. *Cancer* 2005;103:451-61.

- ✍ Lyman GH, Guiliano AE, Somerfield MR, et al. American Society of Clinical Oncology guideline recommendations for sentinel lymph node biopsy in early-stage breast cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:7703-20.
- ✍ Nacional Comprehensive Cancer Network: The NCCN Breast Cancer Clinical Practice Guidelines in Oncology, versión 2.2005. Disponible en <http://www.nccn.org>
- ✍ Sobin LH, Wittekind C, eds. TNM classification of malignant tumors, 6<sup>th</sup> ed. New York: John Wiley & Sons, 2002.
- ✍ Van Zee KJ, Manase DM, Bevilacqua JL, 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;10:1140-1151.
- ✍ Viale G, Maiorano E, Mazaarol G, et al. Histologic detection and clinical implications of micrometastasis in axillary sentinel lymph nodes for patientes with breast carcinoma. *Cancer* 2001;92:1378-84.
- ✍ Viale G, Mastropasqua MG, Maiorano E, Mazzarol G. Pathologic examination of the axillary sentinel lymph nodes in patientes with early-stage breast carcinoma: current and resolving controversies on the basis of the European Institute of Oncology experience. *Virchows Arch* 2006;448:241-247.
- ✍ Weaver DL. Sentinel lymph nodes and breast carcinoma. Which micrometastases are clinically significant? *Am J Surg Pathol* 2003;27:842-45.
- ✍ Weaver DL, Krag DN, Ashikaga T, et al. Pathologic anlysis of sentinel and non-sentinel lymph nodes in breast carcinomas: a multicenter study. *Cancer* 2000;88:1099-107.
- ✍ Weaver DL, Krag DN, Manna EA, et al. Comparison of occult micormetastasis detection in breast cancer sentinel lymph nodes using manual cytokeratin immunohistochemistry and image análisis [Abstract 221]. *Mod Pathol* 2002;15:55A-56A.