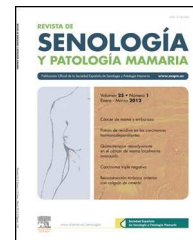




# Revista de Senología y Patología Mamaria

[www.elsevier.es/senologia](http://www.elsevier.es/senologia)



ORIGINAL

## Modelo predictivo multiparamétrico del estatus axilar en pacientes con cáncer de mama: carga tumoral total y perfil molecular. Estudio multicéntrico



Laia Bernet<sup>a,\*</sup>, Juan Miguel García-Gómez<sup>b</sup>, Rafael Cano Muñoz<sup>c</sup>, Antonio Piñero<sup>d</sup>, Ana Karina Ramírez<sup>e</sup>, Maximiliano Rodrigo<sup>f</sup>, Juan M. de la Cámara de las Heras<sup>g</sup>, Octavi Burgués<sup>h</sup>, Irene Ruiz<sup>i</sup> y Bárbara Tormos<sup>j</sup>

<sup>a</sup> Servicio de Patología, Hospital Lluís Alcanyis, Xàtiva, España

<sup>b</sup> Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España

<sup>c</sup> Servicio de Patología, Hospital Universitario de la Ribera, Alzira, España

<sup>d</sup> Servicio de Cirugía, Hospital de la Arrixaca, Murcia, España

<sup>e</sup> Servicio de Patología, Clínica Ceclines, Caracas, Venezuela

<sup>f</sup> Servicio de Patología, Hospital Universitario de Burgos, España

<sup>g</sup> Servicio de Biblioteconomía, Hospital Universitario de la Ribera, Alzira, España

<sup>h</sup> Servicio de Patología, Hospital Clinic Universitari de Valencia, España

<sup>i</sup> Servicio de Patología, Hospital Universitario de Donostia, España

<sup>j</sup> Servicio de Cirugía, Hospital Lluís Alcanyis, Xàtiva, España

Recibido el 28 de diciembre de 2014; aceptado el 11 de abril de 2015

Disponible en Internet el 3 de junio de 2015

### PALABRAS CLAVE

Cáncer de mama;  
Ganglio centinela;  
One step nucleic acid  
amplification (OSNA);  
Metástasis axilar;  
Perfil molecular;  
Nomograma.

### Resumen

**Objetivo:** El objetivo de nuestro estudio es evaluar el impacto combinado de cada uno de los perfiles moleculares del cáncer de mama, subrogados inmunohistoquímicamente junto con la carga tumoral total del ganglio centinela como predictores de afectación metastásica en los ganglios axilares no centinela.

**Material y métodos:** Se incluyeron 373 pacientes de carcinoma infiltrante de mama con ganglio centinela metastásico y linfadenectomía axilar, procedentes de seis hospitales españoles. Se aplicaron los criterios de ST Gallen para definir el perfil molecular. Se realizó un análisis multivariante para definir diferentes modelos predictivos y se estudiaron las distribuciones de densidad de probabilidad de la carga tumoral para cada perfil molecular en los casos con axila metastásica y no metastásica en los ganglios no centinela.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [bernet\\_lai@gva.es](mailto:bernet_lai@gva.es) (L. Bernet).

**Resultados:** Hubo un 66% de linfadenectomías axilares metastásicas. Se obtuvieron 7 modelos predictivos cuyas áreas bajo la curva ROC oscilaron entre 0,65 y 0,77. El mejor modelo fue el basado en la carga tumoral total, tipo histológico, diámetro tumoral, grado, invasión linfovascular, perfil molecular y número total de ganglios centinela. Las mayores diferencias de densidad de probabilidad de la carga tumoral total se producen entre las distribuciones de casos positivos y negativos de los perfiles moleculares BH, TN y HER2.

**Conclusión:** La inclusión del perfil molecular en el modelo mejora el área bajo la curva ROC, especialmente si se incluye también el número total de ganglios centinela. Se observan diferencias entre los distintos perfiles moleculares para el valor predictivo de la carga tumoral total.

© 2014 SESPM. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

## KEYWORDS

Breast cancer;  
Sentinel node;  
One Step Nucleic Acid Amplification (OSNA);  
Metastases;  
Molecular signature;  
Nomogram

## A multiparametric predictive model of axillary status in patients with breast cancer: total tumoral load and molecular signature. A multicenter study

### Abstract

**Objective:** To evaluate the combined impact of each of the immunohistochemically surrogated molecular signatures (PM) of breast cancer subtype along with the total tumor load (CTT) of the sentinel node (SN) as a predictor of non-SN metastatic involvement.

**Methods:** We included 373 patients diagnosed with infiltrating breast cancer with metastatic SN who underwent subsequent axillary lymph node dissection (ALND) from six hospitals. The surrogate MS for each case was defined as per ST Gallen definitions. A multivariate analysis was conducted to estimate the predictive model and normal kernel functions to fit the density distributions of the total tumoral load for each molecular signatures.

**Results:** Metastatic involvement of the axillary lymph node was identified in 66% of the patients. We obtained seven different predictive models with an area under curve (AUC) ranging from 0.65 to 0.77. The best model was based on the CTT, histological type, tumor size, stage, lymphatic invasion, MS, and the total number of SN. The greatest differences in the density functions of the CTT were found in the PM for positive and negative cases of the BH, TN and HER2 subtypes.

**Conclusions:** The inclusion of PM in the multivariate model improved the AUC, especially when the total number of sentinel nodes were included. Differences were observed in the impact of the CTT among the different molecular profiles subtypes.

© 2014 SESPM. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

## Introducción

El tratamiento regional de pacientes con ganglio centinela (GC) metastásico es controvertido ya que los impactos de la linfadenectomía en la recidiva locoregional, intervalo libre de enfermedad y supervivencia global no están totalmente definidos<sup>1-4</sup>.

El ensayo NSABP-B32 demostró que la linfadenectomía axilar (LA) no beneficiaba a las pacientes con GC negativo<sup>5,6</sup> pero existen dudas acerca de si la LA es necesaria en todos los casos de GC metastásico. Los datos de la literatura muestran que, en aproximadamente el 60% de las pacientes, el GC es el único metastásico por lo que la LA podría ser innecesaria. A pesar de que el estudio molecular de la axila muestra mayores tasas de afectación que el estudio convencional<sup>7</sup>, las tasas de recidiva axilar oscilan alrededor del 1% a los 5 años, lo cual cuestiona la indicación sistemática de la LA en todos los casos con ganglios centinela metastásico y sugiere la posibilidad de seleccionar un grupo de bajo riesgo en el que podría evitarse la cirugía axilar<sup>8-11</sup>. El ensayo ACOSOG Z0011 mostró que la LA no ofrece beneficio a las pacientes

de bajo riesgo con uno o 2 GC metastásicos, datos que han sido confirmados en estudios posteriores<sup>4,12</sup>.

Ello ha dado lugar al desarrollo de nomogramas basados fundamentalmente en el diámetro tumoral, tipo histológico de tumor, invasión linfovascular e índice de proliferación (Ki-67)<sup>13-16</sup> para seleccionar pacientes de bajo riesgo de afectación axilar en los que podría evitarse la LA. Aunque el valor predictivo de la mayoría de ellos es bastante bajo, mejora cuando se incluye el diámetro de la metástasis de acuerdo con los criterios del TNM<sup>17</sup>.

La carga tumoral total (CTT) es un concepto derivado del estudio OSNA del GC y estima el volumen de la metástasis de manera más precisa que el TNM, que se basa en la medición en milímetros del tumor, sobre el corte histológico. Se define la CTT como la suma del número de copias de ARNm de la citoqueratina 19 (ARNm-CK-19) de todos los GC y ha sido identificada por algunos autores como el factor independiente predictivo de metástasis en los ganglios axilares no centinela de mayor potencia<sup>18,19</sup>.

La inclusión de la CTT en el modelo predictivo de afectación axilar mejora los valores del área bajo la curva ROC

(AUC) permitiendo una mejor individualización diagnóstica y terapéutica<sup>20-22</sup>. Por otra parte, se ha descrito que la tasa de metástasis axilares no centinelas varía en relación al inmunofenotipo tumoral (PM)<sup>19,20</sup>.

Nuestra hipótesis consiste en que la introducción tanto de la CTT como del PM en el modelo predictivo puede mejorar la predicción individual de metástasis en la linfadenectomía axilar, en los casos con GC positivo.

Nuestro objetivo principal es caracterizar el valor del PM y la CTT, mediante su inclusión en distintos modelos predictivos, para predecir el estado ganglionar del resto de la axila tras la biopsia de GC. El objetivo secundario del estudio es la caracterización de las densidades de probabilidad de la CTT en casos con metástasis positiva y negativa para cada PM. El impacto de este estudio es evitar linfadenectomías axilares innecesarias cuando el GC es positivo dadas las condiciones específicas del inmunofenotipo tumoral y el CTT.

## Material y métodos

### Diseño del estudio

Estudio retrospectivo observacional, multicéntrico, en pacientes diagnosticadas de carcinoma infiltrante de mama con GC metastásico (protocolo OSNA) y linfadenectomía axilar.

### Pacientes

Fueron seiscientos cuarenta y siete (647) pacientes procedentes de seis hospitales españoles. Se consideraron criterios de inclusión: tener un diagnóstico patológico de carcinoma infiltrante de mama, cN0, sin terapia sistémica primaria, sometidas a cirugía conservadora o mastectomía y biopsia selectiva de ganglio centinela. Todos los tumores primarios fueron clasificados según el subtipo molecular de acuerdo con los criterios inmunohistoquímicos subrogados aprobados en ST, Gallen 2013<sup>22</sup>. De los 647 pacientes, solo 373 cumplieron los criterios de inclusión (tabla 1).

### Ganglio centinela y evaluación de la linfadenectomía axilar

Todos los GC fueron estudiados siguiendo el protocolo OSNA recomendado por la SESPM<sup>23</sup>. Los GC metastásicos fueron clasificados, de acuerdo con el número de copias de ARNm-CK-19, en micrometástasis o macrometástasis<sup>24</sup>. Cada uno de los ganglios de la LA fue procesado para estudio histológico siguiendo el método convencional.

### Variables y definiciones

Para cada uno de los casos, se incluyeron en una base de datos electrónica, las siguientes variables: tipo histológico (WHO), diámetro tumoral (en mm), grado (1,2 o 3 siguiendo los criterios de Bloom-Ricardson), invasión linfovascular (sí/no) evaluada en la periferia del tumor, expresión inmunohistoquímica de receptores de estrógenos (RE) y de progesterona (RP) (positivo >1%, negativo <1%) de proliferación Ki67 (0 <14%, 1 >14%) HER2 (Hercep-Test<sup>TM</sup>) (0/1+, 2+, 3+, siguiendo los criterios de la guía 2013)<sup>25</sup> CTT y perfil

molecular subrogado inmunohistoquímicamente (PM). Todos los datos fueron sometidos a un programa de control de calidad en referencia al cumplimiento y estabilidad especial de los mismos<sup>26</sup>.

Las definiciones aplicadas fueron las consensuadas en ST Gallen-2013 con mínimas modificaciones:

- Luminal A (A): positivo para RE y RP, negativo para HER2 y Ki67 < 14%.
- Luminal B (B): positivo para RE, positivo para RP < al 20%, negativo para HER2, Ki-67 ≥ 14%.
- Luminal B/HER2 (B-H): positivo para RE, y positivo para HER2 (RP y Ki-67 no considerado en este grupo).
- HER2 (HER2): negativo para RE y RP, positivo para HER2 (Ki67 no considerado en este grupo).
- Triple negativo (TN): negativo para RE, RP y HER2 (Ki67 no considerado en este grupo).

### Método estadístico

Se aplicaron test de significación estadística para investigar diferencias significativas en variables individuales entre las pacientes LA+ y LA- y entre los distintos PM. Para el análisis de variables continuas (diámetro tumoral y CTT), se aplicó el test de varianza Kruskal-Wallis.

Para las variables discretas, se aplicó el test de Pearson's  $\mu L$  test o el test exacto de Fisher según el número de casos por grupo.

Para los modelos multivariantes, se aplicaron modelos gaussianos. Los modelos gaussianos se estimaron por máxima verosimilitud asumiendo matrices de covarianzas independientes entre clases. Además, se prepararon modelos basados en regresión logística para poder comparar nuestros resultados con los de estudios de la literatura. La evaluación de los modelos se realizó por medio del área bajo la curva ROC (AUC-ROC). Finalmente, se calcularon las distribuciones de densidad de probabilidad de la CTT para LA+ y LA- para cada PM mediante «kernel-density functions». Los modelos estudiados fueron evaluados mediante resustitución. Todos los análisis fueron realizados por medio de Matlab R2011a para Mac OS X.

## Resultados

### Análisis univariante

Según el PM, la mayoría de los casos fueron clasificados como luminal A y luminal B (144, 39 y 142, 38% respectivamente, de un total de 373 casos). Doscientos cuarenta y cinco casos (66%) tuvieron metástasis en la LA. El tipo histológico más frecuente fue ductal infiltrante (CDI, NOS) (326 de 373, 87%). El diámetro tumoral se asoció a LA+ ( $p=0,0014$ ). El grado se asoció al PM ( $p\approx 0$ ). La invasión linfovascular se asoció tanto al PM ( $p=0,0165$ ) como al estado de la LA ( $p=2e-6$ ). El número medio de GC fue de 2.

Tal y como se esperaba, la CTT se asoció al estado de la LA ( $p=1,3269e-06$ ).

**Tabla 1** Descripción de las características de los pacientes

Variable	Todos	A	B	BH	TN	HER2	p	LA-	LA+	p
<i>Muestras</i>	373	144	142	51	22	14		245	128	
<i>Tipo histo.</i>							0,073 <sup>a</sup>			0,057 <sup>a</sup>
CDI	326	115	130	46	21	14		218	108	
CLI	30	19	9	2	0	0		14	16	
Otros	17	10	3	3	1	0		13	4	
<i>Tamaño tumoral (mm)</i>	20,17 ± 11,16, [80,0,2]	19,41 ± 10,8, [65,1]	20,52 ± 9,215, [55,0,2]	20,48 ± 14,84, [80,0,7]	21,86 ± 14,26, [80,7]	20,71 ± 13,06, [47,3]	0,482 <sup>b</sup>	18,92 ± 10,08, [65,0,2]	22,58 ± 12,67, [80,1]	0,001 <sup>b</sup>
<i>Grado</i>							0 <sup>a</sup>			0,793 <sup>c</sup>
1	98	73	21	4	0	0		67	31	
2	192	63	84	36	4	5		125	67	
3	83	8	367	11	18	9		53	30	
<i>KI-67</i>							0 <sup>a</sup>			0,510 <sup>c</sup>
0	169	144	0	18	3	4		108	61	
1	204	0	142	33	19	10		137	67	
<i>ER</i>							0 <sup>1</sup>			0,295 <sup>c</sup>
0	44	0	4	4	22	14		32	12	
1	329	144	138	47	0	0		213	116	
<i>PR</i>							0 <sup>a</sup>			0,033 <sup>c</sup>
0	62	11	10	5	22	14		48	14	
1	311	133	132	46	0	0		197	114	
<i>Her2</i>							0 <sup>a</sup>			0,127 <sup>c</sup>
0	308	144	142	0	22	0		197	111	
1	65	0	0	51	0	14		48	17	
<i>LIV.</i>							0,016 <sup>c</sup>			<0,001 <sup>c</sup>
No	236	102	76	37	12	9		176	60	
Sí	137	42	66	14	10	5		69	68	
<i>N.º centinela</i>							0,675 <sup>a</sup>			0,937 <sup>a</sup>
1	98	41	32	15	6	8		65	33	
2	189	73	77	20	12	7		122	67	
3	69	25	27	11	3	3		45	24	
4	15	3	6	5	1	0		11	4	
5	2	2	0	0	0	0		2	0	

Tabla 1 (continuación)

Variable	Todos	A	B	BH	TN	HER2	p	LA-	LA+	P
CTT	9.513 ± 2.53, [15.36,5.525]	9.335 ± 2.447, [14.73,5.525]	9.946 +2.585, [15.36,5.525]	9.202 ± 2.372, [14.29,5.565]	9.172 ± 2.969, [14.46,5.602]	8.626 ± 2.259, [13.05,5.832]	0.117 <sup>b</sup>	9.035 ± 2.395, [14.95,5.525]	10.43 ± 2.539, [15.36,5.525]	<0,001 <sup>b</sup>
Perfil mol.							0 <sup>a</sup>			0,098 <sup>a</sup>
A	144	144	0	0	0	0		90	54	
B	142	0	142	0	0	0		89	53	
BH	51	0	0	51	0	0		39	12	
TN	22	0	0	0	22	0		18	4	
HER2	14	0	0	0	0	14		9	5	
Met. LA							0,167 <sup>a</sup>			<0,001 <sup>a</sup>
-	245	90	89	39	18	9		245	0	
+	128	54	53	12	4	5		0	128	

Las columnas A, B, BH, TN, y HER2 son los perfiles moleculares. Las columnas LA+ y LA- indican el estado de la linfadenectomía axilar. La tabla muestra tablas cruzadas para las variables discretas y la media ± desviación estándar [y el rango] para las variables continuas. Se han calculado las diferencias significativas de cada variable con respecto al perfil molecular y el estado de la linfadenectomía mediante:

<sup>a</sup> Fisher exact test.

<sup>b</sup> Kruskal Wallis test.

<sup>c</sup>  $\chi^2$  test.

No se encontró relación entre el PM y el estado de la LA ( $p = 0,1$ ), siendo RP la única variable que mostró diferencias significativas en nuestro estudio.

## Modelo multivariante

Todos los modelos multivariantes del estudio incluyeron únicamente variables conocidas o disponibles en el momento de la cirugía.

Inicialmente, se usó en modelo sencillo basado en la CTT (M1) para establecer nuestra línea basal. Para M1, se obtuvo una AUC-ROC de 0,65. Con la inclusión de la invasión linfocascular en el modelo (M2), el AUC-ROC fue de 0,69. El modelo M3 incluyó las variables del modelo M2 más el tipo histológico, el diámetro tumoral y el grado tumoral y se obtuvo una AUC-ROC de 0,71.

En el modelo 4 (M4), se incluyó, además, el PM y se obtuvo un AUC-ROC de 0,74. La inclusión del número de GC en el modelo predictivo (M5) no mejoró el AUC-ROC. En el modelo 6 (M6), se sustituyó el PM por las variables Ki-67, RE, RP y HER2, observándose una ligera mejora del AUC-ROC a 0,77. La [tabla 2](#) describe las variables clínicas, las variables del inmunofenotipo y los factores correctivos incluidos en cada modelo predictivo, junto con su área bajo la curva ROC (AUC-ROC).

## Caracterización de la carga tumoral total con relación al perfil molecular

El interés de esta parte del estudio es encontrar el punto de corte de la CTT cuya densidad de función de los casos positivos estuviera por encima de la densidad de función de los negativos para cada PM. La [figura 1](#) muestra las distribuciones de densidad de probabilidad de la CTT para cada nivel de PM (todos, luminal A, luminal B, luminal B-Her2, triple negativo, HER2). Las distribuciones de los casos positivos se muestran en rojo y las distribuciones de los casos negativos en color azul (el color de esta figura solo puede apreciarse en la versión electrónica del artículo).

La [tabla 3](#) muestra los valores de corte de CTT para cada PM en  $\log(\#/ \mu\text{L})$ , obtenidas a partir de las densidades de probabilidad mostradas en la [figura 1](#). Para cada corte, hemos extraído la sensibilidad (LA+) y especificidad (LA-) sobre los casos de cada PM incluidos en nuestra muestra. El punto de corte para cada PM se ha seleccionado como el primer valor donde la función de densidad de probabilidad de LA+ es mayor que la función de densidad de LA-.

## Discusión

Aunque el impacto de un GC metastásico<sup>3</sup> ha justificado el gesto de la LA durante años, en aproximadamente la mitad de los casos no se observan otros ganglios metastásicos, por lo que se cuestiona si la LA es necesaria para todos los pacientes con GC positivo<sup>4,27</sup>. Identificar qué pacientes con GC metastásico no se beneficiarán de la LA se ha convertido en un importante reto en el tratamiento del cáncer de mama. Para ello, se han desarrollado numerosos nomogramas, la mayoría de los cuales se basan en variables clínicas y morfológicas como el diámetro tumoral, el grado

**Tabla 2** Modelos multivariados basados en variables clínicas, el perfil molecular y factores de corrección

Modelo	Variables clínicas	Perfil molecular	Factor de corrección	AUC
M1	CTT	No	No	0,65
M2	CTT, LIV	No	No	0,69
M3	CTT, tipo histológico, diámetro, grado, LIV	No	No	0,71
M4	CTT, tipo histológico, diámetro, grado, LIV	Perfil Molecular	No	0,74
M5	CTT, tipo histológico, diámetro, grado, LIV	Perfil Molecular	N.º GC	0,74
M6	CTT, tipo histológico, diámetro, grado, LIV	KI67, ER, PR, HER2	N.º GC	0,77

histológico, el índice mitótico y la invasión linfovascular<sup>28</sup>. Todos los modelos predictivos utilizados se basan en modelos multivariantes de regresión logística y su evaluación discriminante ha sido realizada mediante áreas bajo la curva ROC.

Berrang et al. revisan los modelos predictivos publicados y concluyen que la mayoría de ellos sobrestiman el riesgo de macrometástasis y, por el contrario, infraestiman el riesgo de micrometástasis sin que ninguno de ellos alcance valores de AUC  $\geq 0,80$ , considerados «excelentes». La inclusión de la variable «diámetro de la metástasis» en alguno de los modelos mejoró los valores del AUC hasta el 0,75<sup>16,28,29</sup>. Sin embargo, la medida de la metástasis sobre el corte histológico es imprecisa, lo cual dificulta la estandarización y la reproducibilidad de los resultados, limitando el uso de estos modelos.

A pesar de que el estudio molecular del GC detecta mayor número de metástasis que el estudio histológico<sup>7</sup>, la tasa de recidiva axilar oscila alrededor del 1%<sup>12</sup> lo cual puede atribuirse no solo al efecto de la terapia sistémica sino también a la biología inherente a la metástasis, cuya agresividad puede estar determinada, al menos en parte, por el PM del tumor primario. Ello podría implicar que volúmenes tumorales semejantes podrían tener diferente impacto clínico en función del PM.

OSNA, validada como la técnica de elección para el diagnóstico intraoperatorio del GC<sup>30,31</sup>, ha dado lugar al concepto de CTT, definida como la suma del número de copias de cada uno de los GC del paciente y que ha sido considerada por algunos investigadores como la variable independiente con mayor poder predictivo de afectación de los ganglios axilares no centinela<sup>18,19</sup>, y más exacta, precisa y reproducible que la medida histológica sobre el corte de tejido. Nuestro objetivo es caracterizar el valor del PM y la CTT, mediante su inclusión en distintos modelos predictivos, para predecir el estado ganglionar del resto de la axila tras la biopsia de GC.

Hasta donde conocemos, hay muy pocos modelos predictivos que incluyan la CTT. Peg et al. proponen un punto de corte de 15.000 copias para indicar la LA, independientemente del número de GC examinados, con un VPN del 85%, alcanzando valores AUC de 0,71<sup>19</sup>. Piñero et al., siguiendo los criterios del Z0011, proponen un punto de corte de 10.000 copias como valor predictivo de 2 o más ganglios adicionales<sup>32</sup>. Ambos autores encuentran diferencias entre la afectación de los ganglios axilares no centinela y la sobreexpresión de Her2 en el tumor primario<sup>19</sup>, siendo el riesgo mayor para estos tumores que para los luminales A<sup>20</sup>.

Recientemente, el subtipo intrínseco de cáncer de mama, evaluado a partir del subrogado inmunohistoquímico, ha sido relacionado con el estatus del GC<sup>33-35</sup>. El 12<sup>th</sup> ST Gallen International Breast Cancer Conference Expert Panel recomienda aplicar la clasificación del subtipo molecular para planificar las decisiones acerca de la terapia sistémica<sup>34</sup> y propone los siguientes grupos: grupo «HR positivo» (luminal A and luminal B), «HER2 amplified» y «triple negativo».

Nuestros resultados apoyan la inclusión de la CTT y del PM en la toma de decisiones terapéuticas sobre la axila, dado que se observan diferentes puntos de corte en la CTT predictivos de afectación axilar en función del subtipo molecular subrogado inmunohistoquímicamente. La inclusión del PM en el modelo predictivo diferencia grupos de pacientes con CTT y morfología semejantes pero con distinta probabilidad de metástasis axilares no centinela.

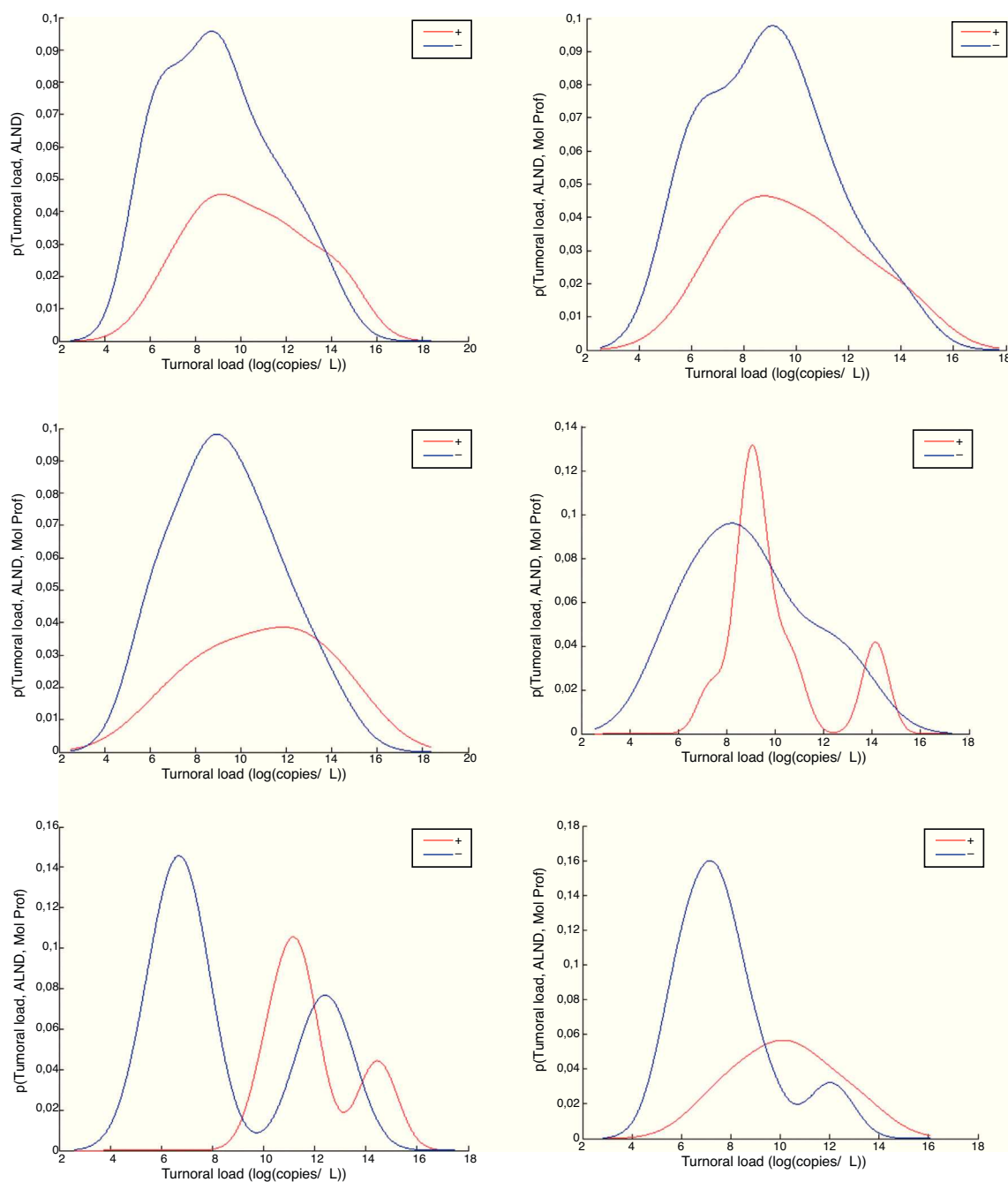
Nuestros resultados, considerando todos los casos en conjunto, están en concordancia con los de Peg et al.<sup>19</sup> que proponen un punto de corte de 15.000 copias por encima del cual existe mayor probabilidad de afectación axilar. Correlacionan también con los de Piñero et al.<sup>32</sup>, que encuentran, para la predicción de 2 o más ganglios axilares metastásicos (criterios Z0011) un punto de corte de 10.000 copias.

Al diferenciar por subtipo molecular, nuestros resultados muestran que el punto de corte para los tumores luminales es mucho más alto que para el resto de PM, lo cual puede

**Tabla 3** Valores de corte para CTT en log(#/μL) para cada PM, así como los valores de sensibilidad y especificidad de los cortes evaluados mediante los casos de cada PM

	Corte	Sensibilidad	Especificidad
Todos	17.000	0,5625	0,6531
A	15.661	0,5185	0,6444
B	25.415	0,6038	0,6404
BH	6.426	0,8333	0,5128
TN	2.400	1	0,6667
HER2	3.6	0,8	0,778





**Figura 1** Distribuciones de densidad de probabilidad de la carga tumoral total para todos los casos y por perfiles moleculares. Fila 1: todos, tipo A; fila 2: B, BH; fila 3: TN, y HER2). Se ha diferenciado entre casos LA+ (en rojo) y LA- (en azul). Los colores de esta figura solo pueden apreciarse en la versión electrónica del artículo.

estar en relación con el comportamiento menos agresivo de estos tumores. El punto de corte para los tumores luminal B es ligeramente mayor que para los luminal A, aunque, dado que las cifras de OSNA se expresan logarítmicamente, estas diferencias son mínimas y probablemente atribuibles a la subjetividad inherente a la interpretación del Ki-67, criterio subrogado mayor, junto con la expresión de RP, para distinguir entre luminal A y B. A su vez, observamos que los tumores de subtipo molecular luminal B-HER2 muestran un punto de corte de 6.426 copias, menor que luminal A y B pero mayor que para los tumores HER2, cuyo punto de corte

es de 3.595 copias, mayor a su vez que las 2.400 copias de los tumores triple negativos. Estos resultados están en concordancia con los tres subtipos predictivos propuestos en ST Gallen para la terapia sistémica<sup>34</sup> y apoyan la evidente relación entre el PM y la capacidad metastásica del tumor.

En base a nuestros hallazgos, existe un cierto número de pacientes con tumores de tipo luminal que, aun con macrometástasis en el GC ( $n.º$  copias  $\geq 5.000$  copias) siguen teniendo un riesgo muy bajo de metástasis axilares adicionales mientras que, por el contrario, en tumores triple negativos, el mismo número de copias indicaría un riesgo

mucho mayor de metástasis adicionales y podría constituir indicación de LA. La inclusión del PM en el modelo predictivo mejora el AUC y permite por tanto mejorar la individualización terapéutica de la paciente. A pesar de estar bien establecidas las diferencias pronósticas entre los distintos PM, son muy escasos los estudios que lo aplican en la evaluación de riesgo de axila metastásica<sup>21,35</sup>. Buglioni et al. demuestran, incluyendo el PM en el estudio multivariante, que los subtipos agresivos como el HER2, se asocian a mayor porcentaje de metástasis axilares<sup>20</sup>.

De acuerdo con estas observaciones, podemos asumir que el PM del tumor primario puede ser clave en el patrón de metástasis y que su inclusión en los modelos predictivos puede mejorar los valores del AUC.

En conclusión, nuestros resultados apoyan el uso de la técnica OSNA como método de elección para el diagnóstico intraoperatorio del GC<sup>23,29,30,36</sup>. A pesar de que el análisis univariante del PM no muestra diferencias estadísticamente significativas entre los grupos LA+ y LA-, la incorporación del PM al modelo predictivo multivariante mejora el AUC (de 0,71 a 0,74), más aún si el PM se incluye desglosado por medio de las variables ER, EP y Ki67 individualizadamente y se aplica el factor de corrección «número de GC» (AUC = 0,77).

La incorporación de factores de corrección al modelo como «número total de GC» permite alcanzar valores de AUC dentro del rango moderadamente predictivo (0,7 < AUC < 0,9). A pesar de que estos valores son comparables a los del estado del arte en relación al GC, es necesario validar prospectivamente nuestros resultados antes de su aplicación clínica. El análisis para los PM luminal B-Her2, TN and HER2 deben ser interpretados teniendo en cuenta el escaso número de casos incluidos para algunas de estas categorías, dada su prevalencia. La implementación de un modelo predictivo del número total de ganglios afectados puede ser imprescindible para planificar el tratamiento radioterápico posterior a la cirugía.

## Responsabilidades éticas

**Protección de personas y animales.** Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

**Confidencialidad de los datos.** Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes.

**Derecho a la privacidad y consentimiento informado.** Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

## Autoría/colaboradores

1. Concepción y diseño: Laia Bernet, Juan Miguel García-Gómez, Rafael Cano.
2. Provisión de casos: Antonio Piñero, Juan M. de la Cámara de las Heras, Maximiliano Rodrigo, Octavi Burgués, Irune Ruiz, Bárbara Tormos.
3. Análisis de datos e interpretación: Laia Bernet, Juan Miguel García-Gómez, Rafael Cano.

4. Soporte administrativo: Laia Bernet, Juan Miguel García-Gómez, Mansur Ata.
5. Escritura del manuscrito: Laia Bernet, Juan Miguel García-Gómez, Rafael Cano.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Bibliografía

1. Viale G, Maiorano E, Pruneri G, Mastropasqua MG, Valentini S, Galimberti V, et al. Predicting the risk for additional axillary metastases in patients with breast carcinoma and positive sentinel lymph node biopsy. *Ann Surg.* 2005;241(2):319–25.
2. Acosta V, Contreras A, Ravelo R, Marín M, Pérez J, Longobardi I, et al. Cáncer de mama ganglio centinela positivo ¿Siempre necesario una disección axilar? *Rev Venez Oncol.* 2008;20:118–22.
3. De Boer M, van Deurzen CH, van Dijck JA, Borm GF, van Diest PJ, Adang EM, et al. Micrometastases or isolated tumor cells and the outcome of breast cancer. *N Engl J Med.* 2009;361(7):653–63.
4. Giuliano AE, McCall L, Beitsch P, Whitworth PW, Blumencranz P, Leitch AM, et al. Locoregional recurrence after sentinel lymph node dissection with or without axillary dissection in patients with sentinel lymph node metastases: the American College of Surgeons Oncology Group 2001 randomized trial. *Ann Surgery.* 2010;252(3):426–32, discussion 432–3.
5. Krag D, Julian T, Harlow S, Weaver DL, Ashikaga T, Bryant J, et al. NSABP-32: Phase III, randomized trial comparing axillary resection with sentinel lymph node dissection: a description of the trial. *Ann Surg Oncol.* 2004;11(13):2085–105.
6. Krag DN, Anderson SJ, Julian TB, Brown AM, Harlow SP, Costantino JP, 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(10):927–33.
7. Vugué L, Rojo F, Hardisson D, Iturriagagoitia AC, Panadés MJ, Velasco A, et al. Comparison of molecular analysis and histopathology for axillary lymph node staging in primary breast cancer: results of the B-CLOSER-I study. *Diagn Mol Pathol.* 2012;21(2):69–76.
8. Veronesi U, Paganelli G, Galimberti V, Viale G, Zurrida S, Bedoni M, et al. Sentinel-node biopsy to avoid axillary dissection in breast cancer with clinically negative lymph-nodes. *Lancet.* 1997;349:1864–7.
9. Giuliano AE, Jones RC, Brennan M, Statman R. Sentinel lymphadenectomy in breast cancer. *J Clin Oncol.* 1997;15(6):2345–50.
10. Krag D, Weaver D, Ashikaga T, Moffat F, Klimberg VS, Shriver C, et al. The sentinel node in breast cancer—A multicenter validation study. *N Engl J Med.* 1998;339(14):941–6.
11. Chen JJ, Wu J. Management strategy of early-stage breast cancer patients with a positive sentinel lymph node: with or without axillary lymph node dissection. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2011;79(3):293–301.
12. Galimberti V, Botteri E, Chifu C, Gentilini O, Luini A, Intra M, et al. Can we avoid axillary dissection in the micrometastatic sentinel node in breast cancer? *Breast Cancer Res Treat.* 2012;131(3):819–25.
13. Bevilacqua JLB, Kattan MW, Fey JV, Cody HS 3rd, Borgen PI, Van Zee KJ. Doctor, what are my chances of having a positive sentinel node? A validated nomogram for risk estimation. *J Clin Oncol.* 2007;25(24):3670–9.
14. Katz A, Smith BL, Golshan M, Niemierko A, Kobayashi W, Raad RA, et al. Nomogram for the prediction of having four or more



- involved nodes for sentinel lymph node-positive breast cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26(13):2093–8.
15. Houvenaeghel G, Bannier M, Nos C, Giard S, Mignotte H, Jacquemier J, et al. Non sentinel node involvement prediction for sentinel node micrometastases in breast cancer: nomogram validation and comparison with other models. *Breast*. 2012;21(2):204–9.
  16. Meretoja TJ, Audisio R, Heikkilä PS, Bori R, Sejbien I, Regitnig P, 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(3):817–27.
  17. Bernet L, Cano R. Metastatic sentinel node and axillary lymphadenectomy revisited. *Gland Surg*. 2012;1(1):7–8.
  18. Ohi Y, Umekita Y, Sagara Y, Rai Y, Yotsumoto D, Matsukata A, et al. Whole sentinel lymph node analysis by a molecular assay predicts axillary node status in breast cancer. *Br J Cancer*. 2012;107(8):1239–43.
  19. Peg V, Espinosa-Bravo M, Vieites B, Vilardell F, Antúnez JR, de Salas MS, et al. Intraoperative molecular analysis of total tumor load in sentinel lymph node: a new predictor of axillary status in early breast cancer patients. *Breast Cancer Res and Treat*. 2013;139(1):87–93.
  20. Buglioni S, di Filippo F, Terrenato I, Casini B, Gallo E, Marandino F, et al. Quantitative molecular analysis of sentinel lymph node may be predictive of axillary node status in breast cancer classified by molecular subtypes. *PLoS one*. 2013;8(3):e58823.
  21. Piñero A, Ruiz G, Bernet L. [Diagnóstico molecular del ganglio centinela en el cáncer de mama]. XVII Congreso de la Sociedad Española de Oncología Radioterápica. Vigo, 18-21 de Junio de 2013 [abstract].
  22. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol*. 2013;24(9):2206–23.
  23. Bernet L, Piñero A, Vidal-Sicart S, Peg V, Giménez J, Algara M, et al. Consenso sobre la biopsia selectiva del ganglio centinela en el cáncer de mama. Revisión 2013 de la Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria. *Rev Senol Patol Mam*. 2014;47(1):22–32.
  24. Tsujimoto M, Nakabayashi K, Yoshidome K, Kaneko T, Iwase T, Akiyama F, et al. One-step nucleic acid amplification for intraoperative detection of lymph node metastasis in breast cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2007;13(16):4807–16.
  25. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. *Arch Pathol Lab Med*. 2014;138:241–56.
  26. Saez C, Martínez-Miranda J, Robles M, García-Gómez JM. Organizing data quality assessment of shifting biomedical data. *Stud Health Technol Inform*. 2012;180:721–5.
  27. Kim T, Giuliano AE, Lyman GH. Lymphatic mapping and sentinel lymph node biopsy in early-stage breast carcinoma: a meta-analysis. *Cancer*. 2006;106(1):4–16.
  28. Berrang T, Lesperance M, Truong P, Walter C, Hayashi AH, Olivotto IA. Which prediction models best identify additional axillary disease after a positive sentinel node biopsy for breast cancer? *Breast Cancer Res Treat*. 2012;133(2):695–702.
  29. Mittendorf E, Hunt K, Boughey J, Bassett R, Degnim AC, Harrell R, et al. Incorporation of sentinel lymph node metastasis size into a nomogram predicting nonsentinel lymph node involvement in breast cancer patients with a positive sentinel lymph node. *Ann Surg*. 2012;255(1):109–15.
  30. National Institute for Health and Care Excellence. [sede web]. Manchester: NICE; August 2013. Intraoperative tests (RD-100i OSNA system and Metasin test) for detecting sentinel lymph node metastases in breast cancer [consultado 15 Oct 2014]. Disponible en: <http://www.nice.org.uk/guidance/dg8>
  31. The Japanese Breast Cancer Society [sede Web]\*. Japan: The Japanese Breast Cancer Society; 2013. Clinical Practice Guidelines Committee. Clinical Practice Guideline of breast Cancer: Do pathological examination of the sentinel lymph node is recommended. [consultado 19 Abr 2014]. Disponible en: <http://www.jbcsftguideline.jp/category/cq/index/cqid/601401>
  32. Piñero A, Ruiz-Merino G, Bernet L, Miguel-Martinez B, Vicente-García F, Viguri-Díaz MA et al. Tumoral load quantification of positive sentinel lymph nodes in breast cancer to predict more than two involved nodes. *Breast*. 2014 Oct 2. pii: S0960-9776(14)00170-2. doi: 10.1016/j.breast.2014.09.005. [Publicación electrónica].
  33. Yin WJ, Lu JS, di GH, Lin YP, Zhou LH, Liu GY, et al. Clinicopathological features of the triple-negative tumors in chinese breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2009;115(2):325–33.
  34. Curigliano G, Criscitiello C, André F, Colleoni M, di Leo A. Highlights from the 13th St Gallen International Breast Cancer Conference 2013. Access to innovation for patients with breast cancer: how to speed it up? *Ecancermedalscience*. 2013;7:299. <http://dx.doi.org/10.3332/ecancer.2013.299>.
  35. Reyat F, Belichard C, Rouzier R, de Gournay E, Senechal C, Bidard FC, et al. Non-sentinel lymph node metastasis prediction in breast cancer with metastatic sentinel lymph node: impact of molecular subtypes classification. *PLoS one*. 2012;7(10):e47390.
  36. Cserni G. Intraoperative analysis of sentinel lymph nodes in breast cancer by one-step nucleic acid amplification. *J Clin Pathol*. 2012;65(3):193–9.