

RECOMENDACIONES DEL CLUB DE PATOLOGÍA MAMARIA DE LA SEAP

Introducción

Alicia Córdoba, coordinadora del club

Correspondencia: alicia.cordoba.iturriagagoitia@cfnavarra.es

Para presentar e introducir estas páginas, he recurrido a la definición de “guía” de la Real Academia Española, en la que se define como: *“Tratado en que se dan preceptos para encaminar o dirigir en cosas, ya espirituales o abstractas, ya puramente mecánicas. Guía de viajes.”* Y este símil de guía de viaje nos puede ser muy útil para ilustrar cuál ha sido la intención de los autores de esta guía: dar unos consejos para encaminar los pasos en un viaje a través de la patología mamaria. En las guías de viajes nadie se siente obligado a visitar todos los museos, ni a comer en todos los restaurantes, ni a hacer todas las excursiones. Nosotros os presentamos una recopilación de las guías más solventes: College of American Pathologists, The Royal College of Pathologists, European guidelines for quality assurance in breast cancer screening and diagnosis (European working group for breast screening pathology), The Royal College of Pathologists of Australasia, American Joint Committee on Cancer (AJCC) y hemos añadido nuestra experiencia, para ofrecer un resumen del proceso del diagnóstico y de la elaboración del informe histopatológico. Como en la guía de viajes, se trata de aconsejar cuáles son las opciones para que sea el patólogo el que decida.

En este sentido queremos resaltar que el documento, que por excelencia refleja la estandarización de la información histopatológica, la AJCC, en su sistema TNM en la séptima edición, en el capítulo del cáncer de mama, deja la decisión final al juicio del patólogo, en varias ocasiones. Es decir que resulta imposible estandarizar todas las situaciones y todos sabemos que hay casos que no encajan en los estándares. Por ello, sin renunciar a la estandarización hay que recuperar la riqueza que supone la elaboración diagnóstica. Y recordar que nuestro trabajo supone el gran reto de interpretar e integrar todos los datos para elaborar un informe que sea fiel a la realidad que hemos visto y estudiado; y que sea comprensible y útil para todos aquellos que deberán utilizarlo comenzando por nosotros mismos.

GUÍA PRÁCTICA DE PATOLOGÍA MAMARIA PARA PATÓLOGOS

ÍNDICE

- **CORRELACIÓN RADIOLÓGICA/ HISTOLÓGICA.**
- **MUESTRAS DIAGNÓSTICAS: CITOLOGÍA Y BIOPSIA.**
- **ESTUDIO DE MUESTRAS QUIRÚRGICAS**
- **ESTUDIO DEL GANGLIO CENTINELA EN CÁNCER DE MAMA. IMPLICACIONES PRONÓSTICAS Y TERAPÉUTICAS**
- **ESTUDIOS Y RECOMENDACIONES DE BIOMARCADORES EN CÁNCER DE MAMA**

Correlación radiológica / histológica.

Maite Mellado y María José Pons.

Servicio de Radiodiagnóstico. Complejo Hospitalario de Navarra.

I. INTRODUCCIÓN

Una adecuada correlación radio-patológica es indispensable para el correcto manejo del cáncer de mama y de las lesiones mamarias benignas.

En el año 2000, el Eusoma (European Society of Breast Cancer Specialists), publicó los requerimientos que deben cumplir las unidades de mama (1,2). Deben contar, con Radiólogos especialistas en cribado y en diagnóstico e intervencionismo mamario, que además se encarguen del seguimiento de las pacientes con cáncer de mama, y con Patólogos con especial interés en patología mamaria.

Hemos asistido a un incremento importante del diagnóstico de lesiones mamarias no palpables, como consecuencia de la amplia difusión de los programas de cribado. Ello ha llevado a un aumento del intervencionismo mamario en las unidades de radiología de mama. La correlación de los hallazgos radiológicos con la descripción patológica es crucial para el manejo apropiado de las pacientes.

El Colegio Americano de Radiología (ACR), con el fin de estandarizar los hallazgos radiológicos en las distintas técnicas de imagen (mamografía, ecografía y resonancia magnética), estableció un sistema de descripción y categorización de los hallazgos en imagen de la mama.

El sistema BIRADS (Breast Imaging Reporting and Data System) clasifica los hallazgos radiológicos en diferentes categorías. A cada una de las categorías se le asigna una actitud a seguir (de seguimiento radiológico o de realización de intervencionismo mamario)(3,4). Los criterios para realizar una punción o una biopsia dirigida se basan en la probabilidad de que la lesión descrita corresponda a un cáncer de mama. Estas categorías sin embargo no son compartimentos estancos y como en cualquier otra área del diagnóstico por imagen existe cierta variación inter-intra observador a la hora de asignar una lesión a una determinada categoría (5,6), condicionada en parte por la experiencia profesional. Además, la indicación de realizar intervencionismo mamario está basada, no sólo en la imagen radiológica, sino también en diferentes factores relacionados con la paciente: edad, antecedentes personales, antecedentes familiares de cáncer de mama, y en si la lesión es o no palpable, etc.

El cribado del cáncer de mama está dirigido a mujeres **asintomáticas**, con el objetivo de disminuir la mortalidad por cáncer de mama. Debemos de evitar, en la medida que sea posible, el intervencionismo mamario de lesiones benignas. La ansiedad que genera la realización de pruebas invasivas en mujeres asintomáticas es uno de los efectos negativos más importantes de los programas de diagnóstico precoz (7). Existen unos estándares radiológicos que deben cumplir los programas de cribado y se recogen en la 4ª edición de la Guía Europea de control de calidad en cribado y diagnóstico del cáncer de mama (European guidelines for quality assurance in breast cancer screening and diagnosis).

En cuanto a la mama **sintomática**, el clínico tiene un papel indispensable en el manejo y seguimiento de las pacientes. El triple diagnóstico continúa siendo el "gold standard" a la hora de descartar la naturaleza

maligna de la lesión (exploración física, hallazgos radiológicos y punción diagnóstica). En estos casos también deberemos realizar una adecuada correlación radio patológica.

En aquellas lesiones que finalmente necesiten cirugía deberemos relacionar los hallazgos radiológicos con los patológicos en la pieza quirúrgica, confirmando la extirpación de la lesión con márgenes adecuados.

II. CLASIFICACIÓN DIAGNÓSTICA

- **Radiología (mamografía, ecografía y/o RM): Clasificación BIRADS (Breast Imaging Reporting and Data System)**

BIRADS 0: Se necesitan estudios adicionales y/o comparación con mamografías anteriores

BIRADS 1: Negativa

BIRADS 2: Hallazgos benignos

BIRADS 3: Hallazgos probablemente benignos

BIRADS 4: Sospechosa de malignidad

BIRADS 5: Alta sospecha de malignidad

BIRADS 6: Malignidad confirmada mediante punción biopsia

En el informe radiológico debe constar la composición del parénquima mamario (grasa, áreas de tejido glandular, heterogéneamente densa o muy densa) y los hallazgos radiológicos: el tipo de lesión (nódulo-masa, distorsión arquitectural, asimetría, calcificaciones, adenopatía, hallazgos asociados), el tamaño y la localización (mama derecha o izquierda, cuadrante o localización horaria, profundidad y distancia al pezón) y si existen lesiones adicionales. Finalmente se asignará una categoría diagnóstica BIRADS y recomendación de manejo.

- **Punción Aspiración con Aguja Fina (PAAF)**

C1: Inadecuado para el diagnóstico

C2: Células epiteliales benignas

C3: Atipia probablemente benigna

C4: Sospechoso de malignidad

C5: Maligna

El resultado de citologías insuficientes debería ser < 25% y es deseable que no supere el 15% y si la lesión es un carcinoma es deseable que este porcentaje baje del 5%

- **Biopsia con aguja gruesa (BAG) y biopsia asistida por vacío(BAV)**

B1: Inadecuado para el diagnóstico/Tejido mamario normal

B2: Benigno

B3: Benigno pero con potencial maligno incierto

B4: Sospechoso de malignidad

B5: Maligno

III. SISTEMAS DE PUNCIÓN Y CONTROL RADIOLÓGICO DEL INTERVENCIONISMO MAMARIO

En la actualidad, los radiólogos disponemos de diferentes sistemas de punción como son: la PAAF, la BAG y la BAV. Dependiendo del tipo de aguja empleada así será la muestra que se remita al servicio de Anatomía Patológica.

- Con la PAAF obtendremos muestras para estudio citológico y se suelen emplear agujas de 24 a 20G.
- Para la BAG disponemos de agujas con calibre de 18 a 14G, siendo el calibre de 14G el empleado con más frecuencia en patología mamaria.
- Para la BAV se suelen emplear agujas de calibre más grueso, entre 11 y 8G. Las agujas de biopsia permiten la obtención de muestras para estudio histológico y realización de técnicas de inmunohistoquímica con resultados fiables.

La principal ventaja de la PAAF es ser una técnica económica y con escasas complicaciones. Sin embargo la tasa de muestras insuficientes o poco representativas, la posibilidad de falsos negativos y positivos, y la mayor dificultad para estudio inmunohistoquímico, la hacen una técnica menos fiable en comparación con la biopsia con aguja gruesa. Aunque hace años su uso era más generalizado, hoy en día sus indicaciones están más limitadas y sólo suele emplearse en evacuación de quistes palpables (no es necesario citología), punción de lesiones hipoeogénicas en las que no queda clara su naturaleza quística (posibilidad de quiste con contenido), citología de áreas palpables inespecíficas (baja sospecha), citología de múltiples nódulos de aspecto probablemente benigno (posibles fibroadenomas), en mujeres jóvenes con nódulos de baja sospecha, o en algunos centros para la punción de adenopatías axilares en pacientes con cáncer de mama (estadificación axilar).

En la biopsia con aguja gruesa se utilizan agujas de corte con sistema trucut que permiten la obtención de uno o varios cilindros de tejido mamario (generalmente se suelen obtener entre 2 y 5 muestras) con los que se puede realizar un estudio histológico y técnicas inmunohistoquímicas fiables. Las muestras con las agujas de vacío son de mayor calibre que las obtenidas con agujas de corte y se suele extraer un mayor número de cilindros (entre 6 y 24 dependiendo del tipo de lesión y de la guía empleada). A diferencia de la BAG, en la que es necesario introducir la aguja para la obtención de cada una de las muestras, en los sistemas de BAV los múltiples cilindros se extraen con una única introducción de la aguja.

La decisión de realizar BAG o BAV depende de varios factores: tipo de lesión radiológica (nódulo, densidad asimétrica, distorsión, microcalcificaciones sobre densidad o microcalcificaciones aisladas) y tipo de guía para realizar la punción (palpación, ecografía, estereotaxia o resonancia magnética). Si la lesión es visible por ecografía, lo más habitual es realizar BAG con control ecográfico. En algunos acúmulos de microcalcificaciones que sean visibles por ecografía (sobre todo cuando asientan sobre densidades), se prefiere también la guía ecográfica, ya que la lesión visible por ultrasonidos suele representar el componente infiltrante (las calcificaciones aisladas con mayor frecuencia corresponden al componente intraductal). Para aquellas lesiones que no sean visibles por ecografía (la mayoría de casos de microcalcificaciones y algunas distorsiones) se utiliza la guía estereotáxica y en estos casos se opta por agujas de vacío que permiten obtener muestras de tejido más representativas, asegurando la presencia de calcificaciones en la muestra. Cuando la biopsia de vacío logra extraer todas las calcificaciones de la lesión, el radiólogo colocará un marcador en el área de biopsia. Si la lesión únicamente es visible por RM se realizará la biopsia guiada por resonancia, empleando aguja de vacío e intentando obtener el mayor número de cilindros. Otro aspecto a tener en cuenta es el coste de la punción que es mayor en los casos de BAV que con los sistemas más sencillos de BAG.

La evaluación de la axila mediante ultrasonidos permite conocer el estado axilar pre-operatorio, siendo la Biopsia Selectiva del Ganglio Centinela (BSGC) la técnica estándar en los casos clínica y ecográficamente negativos. Si en la ecografía se detectan adenopatías "sospechosas", la punción de las mismas hace posible excluir aquellas pacientes que no se beneficiarán de la BSGC. Para la punción de adenopatías se puede emplear tanto la PAAF como la BAG.

IV. CORRELACIÓN RADIO-PATOLÓGICA EN BIOPSIAS PERCUTÁNEAS

Cuando el radiólogo extrae la muestra debe estar seguro que el material que se remite al servicio de anatomía patológica es representativo de la lesión a estudio. En el caso de que la muestra se haya obtenido con guía ecográfica, el control de la punción en tiempo real y la visualización macroscópica de los cilindros permite al radiólogo confirmar que la muestra es representativa. Si se ha realizado BAV de microcalcificaciones, la radiografía con las calcificaciones en los cilindros asegura la fiabilidad de la punción. Para facilitar la labor del patólogo, se recomienda que desde el servicio de Radiología se identifiquen los cilindros que contienen las calcificaciones. Una vez de que el radiólogo está seguro que la muestra obtenida es representativa de la lesión biopsiada, es necesario establecer una correcta correlación con el informe patológico (8). Si la muestra contiene calcificaciones pero en el informe patológico no constan, será necesario avisar al servicio de anatomía patológica para que realice más profundidades en los bloques hasta asegurar el diagnóstico.

Aunque las punciones con agujas gruesas y agujas de vacío son muy fiables, en algunas ocasiones, si no hay adecuada correlación radiopatológica, puede ser necesario repetir la punción para asegurar el diagnóstico. La práctica de reuniones multidisciplinarias puede alertar al patólogo y al radiólogo si se producen discrepancias.

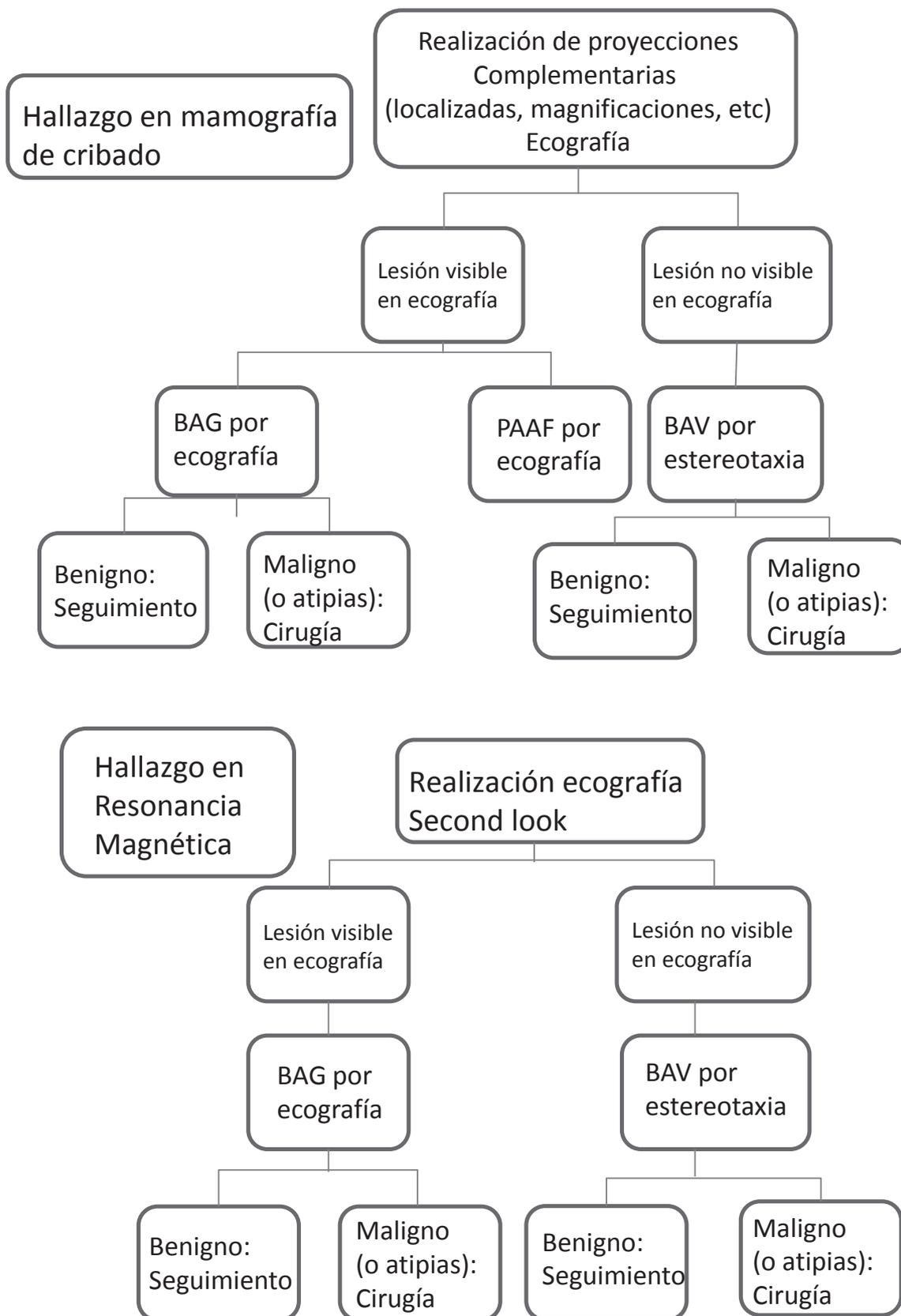
V. CORRELACIÓN RADIO-PATOLÓGICA CON LA PIEZA QUIRÚRGICA

Cuando se extirpa una lesión con guía radiológica, el radiólogo debe confirmar de forma intraoperatoria la inclusión de la lesión en la pieza, con márgenes adecuados. Una vez emitido el informe patológico se efectuará la correlación en cuanto a tamaño y número de lesiones. En el caso de que en la pieza quirúrgica no quede lesión residual se valorará si la misma pudo ser extirpada en la biopsia percutánea (fundamentalmente en casos de biopsia asistida por vacío), confirmando que en el lecho tumoral quedan los signos de la biopsia percutánea previa.

BIBLIOGRAFÍA

1. Blamey RW, Cataliotti L et al. The requirements of a specialist breast unit. *Eur J Cancer* 2000; 36: 2288-93.
2. Wilson ARM, Marotti L, Bianchi S, Biganzoli L, Claassen S, Decker T, Frigerio A, et al. The requirements of a specialist Breast Center. *European Journal of Cancer* 2013; 49: 3579-87.
3. American College of Radiology. *Breast Imaging Reporting and Data System*. 2013
4. American College of Radiology. *Illustrated Breast Imaging Reporting and Data System (BIRADS)*, 3rd ed. Reston, VA: American College of Radiology.
5. Lazarus E, Mainiero MB, Schepps B, Koelliker SL, Livingston LS. BI-RADS Lexicon for US and Mammography: interobserver variability and Positive Predictive Value. *Radiology* 2006; 239: 385-91.
6. Berg WA, Campassi C, Langenberg P, Sexton MJ. Breast Imaging Reporting and Data System: Inter-and Intraobserver variability in feature analysis and final assessment. *AJR*. 2000; 174: 1769-77.
7. Perry N, Broeders M, de Wolf C, Törnberg S, Holland R, von Karsa L. European guidelines for quality assurance in breast cancer screening and diagnosis. Fourth edition – summary document. *Annals of Oncology* 2008; 19: 614-22.
8. Idowu, M; Hardy, LB; Souers, RJ; Nakhleh, RE. Pathologic Diagnostic Correlation With Breast Imaging Findings. A College of American Pathologists Q-Probes Study of 48 Institutions. *Arch Pathol Lab Med* 2012; 136: 53-60.

Algoritmo diagnóstico



BIRADS		Manejo	Probabilidad de cáncer
0	Se necesitan imágenes adicionales o comparar con estudios previos	Rellamada Ver estudios anteriores	No disponible
1	Negativa	Revisiones de cribado	Esencialmente 0%
2	Hallazgos Benignos	Revisiones de cribado	Esencialmente 0%
3	Probablemente benigno	Revisiones intermedias (6 meses) durante 2 años	>0% ≤2%
4	Sospechosa	Obtener muestra de tejido	4a: Baja sospecha >2%≤10% 4b: Sospecha intermedia >10%≤50% 4c: Alta sospecha:>50%≤95
5	Altamente sugestivo de malignidad	Obtener muestra de tejido	>95%
6	Malignidad probada mediante punción biopsia	Cirugía	

Tabla. Correlación entre la terminología empleada por los radiólogos y el diagnóstico histológico.

Masa espiculada	BIRADS 5	Carcinoma invasivo
Distorsión arquitectural	BIRADS 4	Cicatriz radial, Lesión esclerosante compleja Carcinoma invasivo
Nódulo bien definido	BIRADS 4	Benigno (más frecuente): Fibroadenoma, Hamartoma, Phyllodes Maligno: Carcinoma invasivo (alto grado), Carcinoma papilar, Carcinoma mucinoso, Carcinoma medular
Microcalcificaciones agrupadas ramificadas	BIRADS 4	Mastitis de células plasmáticas CDIS alto grado
Microcalcificaciones agrupadas en acúmulo	BIRADS 4	Necrosis grasa, FA, CDIS (grado intermedio/alto), CLIS
Microcalcificaciones finas agrupadas	BIRADS 4	Adenosis esclerosante, Quistes CDIS (bajo grado/intermedio)

CDIS: carcinoma ductal in situ, CLIS: carcinoma lobulillar in situ

Un resultado patológico benigno (C2/B2) debe correlacionarse con los hallazgos en imagen y el grado de sospecha radiológico para determinar si la muestra es representativa de la lesión o si es necesario repetir la punción.

Muestras diagnósticas: Citología y Biopsia.

Alicia Córdoba, Concepción De Miguel, Yerani Ruiz de Azua.

Complejo hospitalario de Navarra, Pamplona

I. INTRODUCCIÓN

El diagnóstico anatomopatológico prequirúrgico es hoy día una exigencia en el manejo de la patología mamaria. Su papel en las lesiones benignas es esencial para evitar cirugía innecesaria y reconducir a las pacientes a su régimen habitual de controles. En los casos de malignidad el objetivo es obtener un diagnóstico definitivo con rapidez para que se pueda completar el tratamiento quirúrgico o neoadyuvante. El diagnóstico prequirúrgico de la patología mamaria se basa en un triple enfoque: clínico, de imagen y morfológico. En el estudio anatomopatológico se incluyen: el estudio citológico, en su mayor parte mediante la punción aspiración con aguja fina (PAAF) y el estudio histopatológico, mediante biopsia por aguja gruesa (BAG) o biopsia asistida por vacío (BAV). Ante la posibilidad de que, tras el tratamiento neoadyuvante, la biopsia obtenida sea la única muestra del tumor disponible, resulta necesario su gestión racional y la obtención de material abundante.

Se utiliza también el estudio prequirúrgico de los ganglios axilares que se exploran mediante ecografía, realizándose BAG o PAAF,

Las técnicas de biopsia han ido reemplazando a los sistemas de PAAF, sobre todo en lesiones no palpables por la facilidad de localización de lesiones con control radiológico (ecografía, mamografía y resonancia magnética) y por el tipo de muestra obtenida, que permitirá realizar todas las técnicas requeridas para un correcto manejo prequirúrgico.

II. GUÍA PARA EL ESTUDIO DE LA BIOPSIA CON AGUJA

La obtención de material histológico con aguja se puede realizar en la consulta, en lesiones palpables, o en el servicio de radiodiagnóstico en aquellas no palpables, bajo control ecográfico o asistida por vacío (ver correlación radio-histológica). Se obtiene un pequeño volumen de tejido. Como desventajas frente a la citología, esta técnica resulta más costosa en tiempo y dinero que la PAAF. Se realiza bajo anestesia local. Si se realiza con control radiológico, se recomienda realizar 5 pases para masas y 10 pases para microcalcificaciones. Entre las ventajas frente a la citología, hay que destacar que permite distinguir entre lesiones in situ e invasoras, consigue una mejor caracterización de lesiones con microcalcificaciones, y permite realizar estudios de inmunohistoquímica y moleculares.

La interpretación de las biopsias requiere una correlación con los hallazgos clínicos y radiológicos que debe reflejarse en el volante de petición. Este debe contener los detalles de la paciente como edad, datos clínicos, hallazgos radiológicos, grado de sospecha radiológica (BIRADS), localización de la lesión.

Los protocolos de fijación deben ajustarse en cada laboratorio, aunque se propone la inclusión inmediata para evitar la isquemia fría que altera la expresión inmunohistoquímica. Se aconseja un máximo de 4

cilindros por cassette. También se han establecido los mínimos de fijación en 6 horas y el máximo hasta 72 horas (ASCO/CAP).

Las muestras con microcalcificaciones deben ser comprobadas con radiografía. Y esto no debe retrasar su introducción en el fijador. Se recomienda realizar tres cortes seriados, para facilitar la observación de las microcalcificaciones, y nuevos cortes hasta la confirmación microscópica de las microcalcificaciones.

III. INFORME –CATEGORIAS DIAGNÓSTICAS

El objetivo de la biopsia es completar la triple estimación diagnóstica (clínica + radiológica + histológica) y su finalidad es proporcionar un diagnóstico definitivo que se consigue en aproximadamente el 90% de los casos.

Los diagnósticos se clasifican en 5 categorías que vienen a completar la clasificación radiológica y cuyo objetivo es orientar la actitud terapéutica. Así hablamos de categorías: B1 hasta B5. No existe una categoría de material inadecuado porque no es posible determinar si corresponde a la lesión radiológica, y este punto debe resolverse en el comité multidisciplinar.

B1 (tejido normal)

Indica que se observan los elementos normales de la mama, ductos, acinos, estroma y tejido adiposo. Y puede corresponder tanto a parénquima normal como a un lipoma.

B2 (lesión benigna)

Cuando la biopsia contiene una lesión benigna. En este grupo se incluyen: fibroadenoma, cambios fibroquísticos, adenosis, adenosis esclerosante, ectasia ductal, y otras lesiones no parenquimatosas como abscesos y necrosis grasa. Se incluyen en esta categoría la hiperplasia ductal sin atipia/ hiperplasia columnar sin atipia/ cambio columnar sin atipia.

B3 (lesión con potencial maligno incierto)

Corresponde a lesiones benignas con riesgo potencial de acompañar a lesiones malignas. Así hasta un 25% podrán tener una neoplasia asociada. En esta categoría se ha subdividido en:

- B3a: lesiones sin atipia:
 - Cicatriz radial /lesión esclerosante compleja sin atipia:
 - Lesiones con área central de fibroelastosis, con atrapamiento de ductos. Ocasionalmente se acompañan de hiperplasia ductal.
 - Lesiones papilares: Estas lesiones son heterogéneas. Se incluye en esta categoría aquellas que no muestran hiperplasia y corresponden a papilomas.
 - Hiperplasia lobulillar: ocupación lobular focal por células pequeñas, monomorfas de citoplasma claro, discohesivas.

En esta categoría se propone una actitud terapéutica expectante sin cirugía, y con seguimiento, siempre que hayan sido evaluadas en el comité de mama de forma individualizada.

- B3b: Reúne a las lesiones con atipia:
 - Cambio columnar con atipia, con seriación nuclear. Desproporción núcleo/citoplasma y macro-nucleolos.
 - Hiperplasia ductal con atipia (HDA); distensión de ductos, monomorfismo celular, núcleos ligeramente aumentados. La lesión sugiere un carcinoma in situ de bajo grado, pero no reúne el tamaño suficiente para ser afirmado.
 - Hiperplasia columnar con atipia: revestimiento columnar con pseudoestratificación, atipia celular (desproporción núcleo/citoplasma, hiper cromasia, mitosis) y atipia arquitectural (luces cribiformes, expansión franca).
 - Atipia plana.

- Lesiones papilares: Si muestran atipia moderada o extensa proliferación. Ante la sospecha de carcinoma intraductal asociado. (Anexo 1)
- Carcinoma lobulillar in situ (CLIS): casos con ocupación completa y franca distensión y ocupación completa de los acinos. Las células son discohesivas, de crecimiento sólido. Los casos de CLIS florido/pleomórfico se asocian a necrosis y calcificación y deben contemplarse como B5 y ser tratados como carcinoma ductal in situ (CDIS).

Para todas estas lesiones se propone una extirpación quirúrgica, aunque deben ser consideradas de forma individualizada y reuniendo los datos radiológicos, clínicos e histológicos. (Anexo1)

B4 (sospechoso de ser maligno)

La lesión es sugestiva de ser maligna pero no puede confirmarse, por escasez del material o por problemas de fijación o artefacto. Si se observan grupos de células atípicas, sin relación con los cilindros inmersos en material hemorrágico, o si la cantidad de tumor es tan escasa que impide el estudio inmunohistoquímico se clasifican como B4.

B5 (maligno)

Se utiliza para los casos que son claramente malignos en la biopsia. Se debe de categorizar en in situ o infiltrante cuando sea posible y entonces se subdividen en: B5a-in situ, B5b-infiltrante, B5c- indeterminado.

Otros lesiones malignas no carcinoma (como linfoma, sarcoma) se clasifican como B5.

IV. GUÍA PARA EL ESTUDIO CITOLÓGICO DE LA PATOLOGÍA MAMARIA

El estudio citológico constituye un método rápido, sencillo y poco invasivo y con un alto valor predictivo, que forma parte de la mayoría de protocolos de actuación de las unidades de mama. Su rendimiento se ve incrementado, si los patólogos especializados en citopatología tienen un buen conocimiento de la histopatología de la mama, lo cual reducirá el número de diagnósticos falsos positivos (como puede suceder en artefacto de fijación/tinción, atipia secundaria a inflamación y radioterapia, lesiones papilares, mucinosas, lesión ductal esclerosante, adenosis microglandular y la necrosis grasa) y falsos negativos (como puede suceder en muestras hipocelulares, neoplasia lobulillar, el carcinoma in situ y el carcinoma de bajo grado).

Es importante establecer unas categorías diagnósticas citohistológicas de las muestras así obtenidas, con criterios estrictos, para poder encuadrar cada una de las muestras en una categoría concreta. Esto nos permitirá valorar con mayor precisión la eficacia de las diferentes técnicas diagnósticas. La mayoría de los países europeos utilizan un sistema de categorías diagnósticas para las PAAF de mama.(C1-C5)(1,2), que se clasifican como:

C1 Inadecuada: Muestra escasa, acelular ó artefactada.

El término inadecuado tiene un gran componente subjetivo y depende de la experiencia del patólogo.

Escasa: Menos de cinco grupos de células epiteliales.

Artefactada:

- Muestra estirada por excesiva presión en la extensión.
- Muestra seca por retraso en la fijación o por secarse muy despacio.
- Extensión gruesa, con mucho material amontonado y superpuesto o con mucha sangre.

C2 Benigna: Muestra adecuada sin evidencia de malignidad.

C3 Atipia probablemente benigna: Muestra benigna pero con ciertas características no comúnmente vistas en un aspirado benigno: pleomorfismo nuclear, pérdida de cohesión celular, cambios celulares debidos a la influencia hormonal. Se admite que un 20% de los casos así diagnosticados sean malignos.

C4 Sospechosa de malignidad: Material muy sugestivo pero no diagnóstico de malignidad, por tres razones:

- Muestra escasa o artefactada.
- Muestra con algunos criterios de malignidad pero sin células claramente malignas.
- Muestra con la mayor parte del material con criterios de benignidad y sólo alguna célula maligna.

Se admite que el 80% de los casos así diagnosticados sean malignos.

C5 Maligna: Muestra adecuada y con células con criterios característicos de carcinoma u otras lesiones malignas.

Lo importante para un servicio de patología es saber si sus diagnósticos citológicos se encuentran dentro de unos estándares mínimos establecidos, ya que sino la decisión terapéutica no podrá basarse en el diagnóstico citológico.

Estándares mínimos sugeridos:

- Sensibilidad absoluta: > 60%
- Sensibilidad completa: >80%
- Especificidad: >60% (incluyendo los casos no biopsiados)
- Valor predictivo positivo: >98%
- Índice de falsos negativos: <5%
- Índice de falsos positivos: <1%
- Índice de inadecuados: <25%
- Índice de inadecuados en muestras de carcinomas: <10%
- Índice de sospechosos: <20%.

Estas cifras dependen de la técnica de aspiración y de la experiencia del aspirador. Las cifras están interrelacionadas y la mejora de unas afecta a otras. El intento de reducir el índice de inadecuados aumentará el de sospechosos, mejorará la especificidad incrementando el índice de falsos negativos.

En el momento actual, tal como se refleja en un estudio reciente realizado en nuestro país (3), el estudio citológico se realiza sobre todo para establecer el estatus ganglionar prequirúrgico para la indicación de la técnica de la biopsia selectiva de ganglio centinela (4-9).

BIBLIOGRAFIA

1. Ellis IO1, Humphreys S, Michell M, Pinder SE, Wells CA, Zakhour HD; UK National Coordinating Committee for Breast Screening Pathology; European Commission Working Group on Breast Screening Pathology. Best Practice No 179. Guidelines for breast needle core biopsy handling and reporting in breast screening assessment. *J Clin Pathol.* 2004 Sep; 57(9):897-902.
2. Pathology reporting of breast disease A Joint Document Incorporating the Third Edition of the NHS Breast Screening Programme's Guidelines for Pathology Reporting in Breast Cancer Screening and the Second Edition of The Royal College of Pathologists' Minimum Dataset for Breast Cancer Histopathology. NHSBSP Publication No 58 January 2005.
3. European guidelines for quality assurance in breast cancer screening and diagnosis Fourth Edition. Further information on the Health & Consumer Protection Directorate-General is available at: http://europa.eu.int/comm/dgs/health_consumer/index_en.htm
4. Rakha EA1, Lee AH, Jenkins JA, Murphy AE, Hamilton LJ, Ellis IO. Characterization and outcome of breast needle core biopsy diagnoses of lesions of uncertain malignant potential (B3) in abnormalities detected by mammographic screening. *Int J Cancer.* 2011 Sep 15;129(6):1417-24. doi: 10.1002/ijc.25801. *Epub* 2011 Feb 11.

5. De Beça FF¹, Rasteiro C, Correia A, Costa S, Amendoeira I. Improved malignancy prediction by B3 breast lesions subclassification. *Ann Diagn Pathol.* 2013 Oct;17(5):434-6. doi: 10.1016/j.anndiagpath.2013.05.003. Epub 2013 Jun 15.
6. Lakhani, S.R., Ellis. I.O., Schnitt, S.J., Tan, P.H., van de Vijver, M.J. WHO Classification of Tumours, Volume 4 IARC WHO Classification of Tumours, No 4
7. European guidelines for quality assurance in breast cancer screening and diagnosis. Fourth Edition Supplement. Editor C.A. Wells.
8. European Commission. European Guidelines for Quality Assurance in Mammography Screening (ed 4). Sheffield, UK. Office for official publications of the European Communities. 2006, pp 238-248.
9. Kocjan G, et col. The role of breast FNAC in diagnosis and clinical management: a survey of current practice. *Cytopathology* 2008,19: 271-278
10. Tresserra F, Castella M, Fernandez-Cid C, Fabra G, Dominguez M, Ramos C y Martinez-Lanao MA. Encuesta nacional sobre el estado actual del estudio citológico de la patología mamaria. *Patología* 2014, 47(3): 142-148.
11. Kocjan G, et col. The role of breast FNAC in diagnosis and clinical management: a survey of current practice. *Cytopathology* 2008,19: 271-278.-
12. Leenders M, Richir M, Broeders M, Moorman G, Mollema R, Lopes Cardozo A, et al. Axillary staging by ultrasound-guided fine-needle aspiration cytology in breast cancer patients. Still up to day?. *Breast J.* 2013;19: 637-42.
13. Ahn HS, Kim SM, Jang M, La Yun B, Kim SW, Kang E, et al. Comparison of sonography with sonographically guided fine-needle aspiration biopsy and core-needle biopsy for initial axillary staging of breast cancer. *J Ultrasound Med.* 2013; 32: 2177-84.
14. Mainiero MB. Regional lymph node staging in breast cancer: The increasing role of imaging and ultrasound-guided fine-needle aspiration cytology in breast cancer patients. *Radiol Clin North Am.* 2010; 46: 989-97.
15. Sauer T, Karesen R. The value of preoperative ultrasound guided fine-needle aspiration cytology of radiologically suspicious axillary lymph nodes in breast cancer. *Cytojournal.* 2014;11:26
16. Jing X, Wey E, Michael CW. Diagnostic value of fine needle aspirates processed by ThinPrep® for the assessment of axillary lymph node status in patients with invasive carcinoma of the breast. *Cytopathology* 2013; 24:372-6.

ANEXO 1
Características de lesiones columnares y de Hiperplasia Ductal Atípica (HDA) / Carcinoma Ductal In Situ (CDIS)

Según - European guidelines for quality assurance in breast cancer screening and diagnosis Fourth Edition Supplement

Característica	DIAGNÓSTICO			
	Cambio de células columnares	Hiperplasia de células columnares	Lesión de células columnares con atipia(LCC) **	HDA/CDIS
Topografía	Unidad tubulolobulillar (UTDL), acinos pueden estar ligeramente dilatados o de tamaño normal	UTDL, acinos pueden estar ligeramente dilatados o de tamaño normal	UTDL, frecuentes acinos microquística-mente dilatados	UTDL +/- ductos adyacentes
Forma de espacios acinares	Margen luminal de forma irregular	Margen luminal de forma irregular	Frecuentes espacios acinares redondos, con margen interno liso	Frecuentes acinos redondos, pero con estructuras complejas extendiéndose a la luz (véase arquitectura abajo)
Arquitectura	Plana	Crestas y montículos	Plana o con crestas/ montículos, no complejos	Compleja con estructuras micropapilares o cribiformes
Estratificación/multicapa	No presente	Presente	Puede estar presente	Puede estar presente
Secreciones lumbinales con frecuentes microcalcificaciones	Presentes	Presentes	Presentes	Pueden estar presentes
Tamaño nuclear	Pequeño a mediano	Pequeño a mediano	Pequeño a mediano	Pequeño a mediano
Forma nuclear	Oval, elongada	Oval, elongada	Frecuente, pero no siempre redonda	Redonda
Textura nuclear	Suave	Suave	Puede haber patrón de cromatina moteada	patrón de cromatina moteada
Pleomorfismo*	Uniforme	Uniforme	De uniforme a moderadamente pleomórfico	Uniforme

	DIAGNÓSTICO			
Posición de los núcleos dentro de la célula	Situados basalmente	Situados basalmente	Frecuentemente central	Central
Nucleolos	No conspicuos	No conspicuos	Evidentes	Pueden estar evidentes
Mitosis	Generalmente ausentes	Generalmente ausentes	Generalmente escasas	Generalmente escasas
Extensión	Focal o extensa	Puede ser focal o extensa	Puede ser un área focal dentro del fondo de LCC no atípica	Puede ser un área focal en el fondo de LCC no atípica. Por definición HDA es pequeña/microfocal

* Si hay marcado pleomorfismo entonces la lesión no cae en el espectro de LCCL pero debería ser considerada como CDIS

Estudio de muestras quirúrgicas

Alicia Córdoba.

Complejo hospitalario de Navarra, Pamplona

I. INTRODUCCIÓN

El correcto manejo quirúrgico y terapéutico de las pacientes con cáncer de mama depende en gran medida de la información que se deriva del informe histopatológico. La elaboración de un informe completo y de calidad comienza en la recepción y preparación de la pieza o biopsia quirúrgica.

Las piezas que proceden de los programas de detección precoz presentan más dificultades por tratarse de tumores pequeños, no palpables, y con frecuencia lesiones complejas.

La utilización de la resonancia magnética ha incrementado la presencia de lesiones con poco reflejo en la mamografía (carcinoma lobulillar) y de lesiones múltiples y/o multifocales. La introducción de la neoadyuvancia dificulta el estudio macro y microscópico de las piezas, especialmente la selección de las áreas del lecho tumoral.

La estandarización de los programas de prevención y de los protocolos quirúrgicos y terapéuticos, nos exige uniformidad en la evaluación de los casos y de los informes. Sin embargo en todas las guías consultadas siempre la decisión final respecto a la mayor parte de los temas se deja al juicio de patólogo.

II. ESTUDIO MACROSCÓPICO

El tipo de resección depende, en general, del diagnóstico preoperatorio (triple determinación: clínica + radiológica + histológica). El diagnóstico debe realizarse mediante biopsia o PAAF, y no se recomienda derivar el diagnóstico histológico al acto quirúrgico mediante biopsia intra-operatoria. Si no existe un diagnóstico preoperatorio definitivo, se recomienda realizar una biopsia quirúrgica limitada a la lesión, que deberá ser marcada con arpón en caso de lesión no-palpable. Este mismo principio de economía se recomienda para las lesiones benignas, para evitar los defectos cosméticos. Para las lesiones malignas el tipo de cirugía dependerá de la naturaleza, tamaño, localización, edad de la paciente, tratamiento posterior y desde luego de la elección de la paciente.

Los tipos de resección son:

- Resección parcial: que no incluye toda la mama, y en general no incluye la areola y pezón. Se dividen en mastectomía parcial, tumorectomía o cuadrantectomía. Estas pueden estar guiadas con arpón, en caso de lesiones no palpables, o sin arpón cuando la escisión compromete a lesiones palpables.
- Mastectomía total: con extirpación de todo el tejido mamario. Se subdivide en
 - Simple: toda la mama sin axila
 - Radical modificada: incluye toda la mama y la axila. Algunas veces fragmentos de músculo pectoral.
- Hay otros tipos menos frecuentes: conservadora de piel o de pezón, y la mastectomía radical, casi en desuso.

III. PREPARACIÓN DE LAS PIEZAS Y TALLADO

El volante de solicitud debe incluir toda la información necesaria de la paciente, de la lesión extirpada y del procedimiento quirúrgico. La pieza debe llegar marcada y orientada desde el quirófano (mediante hilos, grapas o tinta) Son aconsejables los hilos de cierta longitud que facilitan su visualización después del marcaje de los bordes con tinta. Si se recibe más de una pieza es necesario conocer la relación espacial entre ellas. La lesión extirpada debe recibirse entera sin cortes.

Las piezas de resección parcial pueden ser estudiadas radiológicamente para determinar la presencia de la lesión principal y su localización, otras lesiones secundarias y la situación de los bordes. Este procedimiento debe realizarse en el menor tiempo posible, para acortar la isquemia fría y su efecto sobre las células tumorales, preservando así la capacidad antigénica y las moléculas, que serán analizadas en los estudios inmunohistoquímicos y moleculares. El tiempo hasta la fijación en formol debe reducirse a 1 hora. En este intervalo debe realizarse la selección de material para banco de tumores, bajo supervisión del responsable de la pieza y teniendo en cuenta que la toma de material nunca puede comprometer la evaluación completa de la lesión.

La pieza debe ser pintada con tinta china por toda la superficie que corresponde al borde quirúrgico y posteriormente pasada por ácido acético (vinagre común). La fijación en formol es esencial para la preservación de los detalles morfológicos que configuraran, entre otros, el grado histológico. Debe realizarse sumergiendo la pieza en formol tamponado en un volumen por lo menos doble al del fragmento.

Resección parcial:

Debe ser orientada por el cirujano. Una vez marcados los bordes, se pueden realizar cortes completos separados por gasas, o cortes profundos para facilitar la fijación sin perder la orientación. Se deben proporcionar el tamaño en tres dimensiones de la pieza y de la lesión y la distancia macroscópica a los bordes. El número de bloques a realizar dependerá del tamaño de la pieza y de la lesión. Se propone la inclusión "in toto" de piezas de menos de 3 cm. En las mayores, se aconseja la inclusión completa de la lesión macroscópica. Se recomienda un corte completo del tumor en un cassette para su medida, cuando sea posible, y cortes del tumor y del tejido circundante hasta los márgenes para evaluar la relación con los bordes quirúrgicos. Además también se deben incluir otras lesiones detectadas macroscópicamente.

Piezas de mastectomía:

Debe ser orientada por el cirujano y resulta recomendable un gráfico con la localización de la lesión. Se debe proceder con la mayor rapidez al tintado, corte y colocación en formol. Debido al tamaño generalmente grande, los cortes han de ser profundos (0,5-1 cm) siguiendo los ejes 6-12 horas. Además, realizar un corte completo de la lesión macroscópica, para que la fijación sea rápida y completa. El pezón y la areola se estudian mediante corte perpendicular al conducto galactóforo y paralela al orificio central en el pezón. Se pueden hacer cortes adicionales del resto de los cuadrantes. Si no se observa lesión macroscópica se requiere palpación para detectar áreas de mayor consistencia. Seleccionar también las áreas blanquecinas de fibrosis y desechar las áreas amarillas de tejido adiposo.

IV. INFORME HISTOPATOLOGICO

LESIONES MALIGNAS NO INVASIVAS

Carcinoma ductal in situ (CDIS o carcinoma intraductal,) es una proliferación epitelial maligna que se ubica restringida a los conductos y acinos mamarios, sin rebasar la membrana basal.

Grado

Se clasifican en tres grados basados en el tamaño nuclear, arquitectura de la proliferación (polarización de los núcleos) y necrosis. El tamaño nuclear se evalúa bajo la lente de 40 aumentos y se deben comparar los núcleos del CDIS con los núcleos de las células ductales normales y/o eritrocitos.

	Grado I	Grado II	Grado III
Pleomorfismo	Monomorfismo	Pleomorfismo moderado	Gran pleomorfismo
Tamaño nuclear	1.5 ó 2 veces eritrocito/ célula ductal normal	Entre 2 y 3 veces	> 3 veces eritrocito/ célula ductal normal
Mitosis	Escasas	Intermedio	Frecuentes y atípicas
Polarización nuclear	Basal	Cierta polaridad	Sin polaridad
Patrón	Micropapilar/cribiforme	Sólido/ micropapilar/ cribiforme	Sólido
Necrosis	Raro	Frecuente y Focal	Focal/comedo

La necrosis en el CDIS se correlaciona con las microcalcificaciones, porque es el material necrótico el que, en general, se calcifica. La necrosis se clasifica en:

- Central (o comedonecrosis): la necrosis se ubica en la porción central y ocupa la mayoría del diámetro del ducto. Persiste un ribete celular periférico de crecimiento sólido y de alto grado.
- Focal: focos pequeños de necrosis no visibles con poco aumento.

Subtipos histológicos (WHO, 2012)

- Carcinoma ductal in situ
- Neoplasia lobulillar in situ:
 - Carcinoma lobulillar in situ:
 - Clásico
 - Pleomórfico
- Papiloma intraductal con carcinoma ductal in situ
- Papiloma intraductal con carcinoma lobulillar in situ
- Carcinoma papilar intraductal
- Carcinoma papilar sólido in situ
- Variantes poco frecuentes: apocrino, neuroendocrino, fusocelular, escamoso, de células claras, En anillo de sello.

Tamaño tumoral:

Aunque el tamaño tumoral del carcinoma in situ no es un requisito para la calificación TNM (pT), es un factor importante para el manejo del paciente. La extensión se correlaciona con probabilidad de lesión residual, afectación de márgenes, recidiva local y la posibilidad de lesión infiltrante. La extensión del CDIS es una estimación del volumen de tejido afectado. Las dificultades de su evaluación precisa radican en la diseminación del CDIS de carácter discontinuo en un complejo sistema tridimensional de conductos ramificados, que se distorsionan en los procedimientos diagnóstico (biopsia), quirúrgico y radiológico postquirúrgico (compresión).

Se proponen los siguientes intervalos (CAP, 2013):

- Hasta 20 mm (estudio histológico completo recomendado)
- Entre 20 y 40 mm (estudio completo posible pero difícil)
- Más de 40 mm (estudio completo impracticable)

Se proponen sistemas de cálculo del tamaño:

- Diámetro total en lesión pequeña si está incluido en un bloque
- Suma de bloques con CDIS si se utilizan cortes secuenciales
- Si los cortes no son secuenciales con la formula (numero de bloques x 0,4cm= extensión).

LESIONES MALIGNAS INFILTRANTES

Se trata de crecimiento tumoral de carácter infiltrante, que en general se acompaña de crecimiento intraductal asociado. En este caso se debe atender inicialmente al subtipo histológico que proporciona información pronóstica y valor predictivo.

Subtipos histológicos (WHO, 2012)

1. Carcinoma infiltrante:
 - Carcinoma pleomórfico
 - Carcinoma con células gigantes tipo osteoclasto
 - Carcinoma con rasgos coriocarcinomasos
 - Carcinoma con patron melanocítico
2. Carcinoma lobulillar infiltrante
3. Carcinoma tubular
4. Carcinoma cribiforme
5. Carcinoma mucinoso
6. Carcinoma con patron medular:
 - Carcinoma medular
 - Carcinoma medular atípico
 - Carcinoma infiltrante con patrón medular
7. Carcinoma con diferenciación apocrina
8. Carcinoma con diferenciación en anillo de sello
9. Carcinoma micropapilar infiltrante
10. Carcinoma metaplásico SAI
 - Carcinoma adenoescamoso de bajo grado
 - Carcinoma metaplásico tipo fibromatosis
 - Carcinoma escamoso
 - Carcinoma metaplásico con:
 - Diferenciación condroide
 - Diferenciación ósea
 - Otros tipos de diferenciación mesenquimal
 - Carcinoma metaplásico mixto
 - Carcinoma mioepitelial
11. Carcinoma con patrón neuroendocrino:
 - Tumor neuroendocrino bien diferenciado.
 - Carcinoma neuroendocrino poco diferenciado (carcinoma célula pequeña)
 - Carcinoma con diferenciación neuroendocrina.
12. Carcinoma secretor
13. Carcinoma papilar invasor
14. Carcinoma de celulas acinares

15. Carcinoma mucoepidermoide
16. Carcinoma polimorfo
17. Carcinoma oncocítico
18. Carcinoma rico en lípidos
19. Carcinoma rico en glucógeno
20. Carcinoma sebáceo
21. Tumores tipo glandula salivar/anejo cutáneo
22. Carcinoma papilar encapsulado/con invasión
23. Carcinoma papilar solido infiltrante
24. Carcinoma microinvasor
25. Otros:
 - a) Sarcomas (liposarcoma, angiosarcoma, osteosarcoma, leiomiomasarcoma)
 - b) Tumores fibroepiteliales malignos (tumor phillodes maligno)
 - c) Enfermedad de Paget
 - d) Linfomas
 - e) Metástasis de tumores extramamarios

Hablaremos de:

Subtipos puros: cuando el 90% de la superficie tumoral corresponde a un subtipo concreto. Es muy relevante si este subtipo tiene asociado un pronóstico concreto: buen pronóstico o mal pronóstico.

Mixtos: cuando el tumor no presenta ningún subtipo especial en la mitad de la lesión será simplemente un carcinoma infiltrante, si entre el 10 y el 40 % muestran un tipo especial hablaremos de carcinoma mixto infiltrante + subtipo especial o carcinoma infiltrante + carcinoma lobulillar.

Localización del tumor

Conviene reflejar en el informe la localización del tumor y/o tumores, aunque su disposición suele ser informada por el cirujano. A veces la ubicación en la pieza quirúrgica es un poco diferente a su localización "in vivo" posicionado sobre la parrilla costal. Cuando la extirpación se produce tras neoadyuvancia, y no existe tumor infiltrante residual, se refiere su localización junto a la marca radiológica como lecho tumoral.

Tamaño tumoral

El tamaño tumoral en uno de los factores pronósticos más importantes. Para su determinación hay que seguir unas recomendaciones que se recogen de la AJCC, CAP, ECWGBSP. El diámetro máximo de un carcinoma infiltrante se usa para determinar el pT (AJCC). Por convención, se mide el diámetro en centímetros y la distancia al margen en milímetros. Se redondea a la baja cuando el tumor supera ligeramente un punto de corte. Así si un carcinoma mide 1,01 cm, el diámetro es 1.0 y pT1b. Para los tumores menores de 2 cm la determinación más exacta es la realizada sobre un corte histológico. Por lo que se recomienda realizar un corte completo de la lesión. Prestar atención a las lesiones ovoideas, para seleccionar el diámetro máximo. Para lesiones de más de 2cm, es más exacta la medida macroscópica.

Algunas precisiones para situaciones concretas:

- Carcinoma infiltrante con CDIS: se mide el área máxima de infiltración del estroma, no se incluye el CDIS. Si los focos de carcinoma infiltrante son múltiples entremezclados con CDIS se mide el diámetro completo.
- Carcinomas pequeños que han sido biopsiados: si la lesión es menor a 10 mm, puede que el diámetro sea mayor en la biopsia-core que en la pieza. Se considera el diámetro mayor y nunca se suman ambos diámetros. Si la zona de biopsia es extensa, y con amplia reacción, habrá que valorar el diámetro de la pieza escisional, biopsia-core y el tamaño radiológico.
- Carcinomas múltiples: utilizar únicamente el diámetro del mayor, y añadir el modificador "m" tras la letra T, entre paréntesis. Se recomienda no obstante informar del tamaño del resto de nódulos para tener una mejor valoración del volumen tumoral total.

- Carcinomas infiltrantes múltiples muy próximos (<5mm), hay que estudiar el tejido entre ambos. Si en esa área intermedia detectamos crecimiento tumoral se deben considerar como un único nódulo.
- Carcinoma infiltrante dividido en varios fragmentos se anotara el diámetro máximo. Si el Carcinoma aparece atravesado por el plano quirúrgico. Se mide el diámetro máximo en la pieza y se añade una nota de que el tamaño total puede ser mayor. Seleccionar el calificador pTX.
- Carcinoma microinfiltrante: se define como uno o más focos de carcinoma infiltrante asociados a CDIS, y ninguno debe rebasar 1 mm de diámetro (aproximadamente 2 campos de gran aumento). En general se asocia a CDIS de grado III (tipo comedocarcinoma) o CLIS de tipo pleomórfico. Las células del tumor deben alcanzar el estroma no-especializado y acompañarse de reacción desmoplásica. No se debe confundir la invasión con la extensión acinar de la neoplasia. Se deben desechar los grupos redondeados y buscar las células infiltrantes de carácter aislado o en hileras. Si existen múltiples focos se aplica el criterio general y solo se mide el mayor. La utilización de inmunohistoquímica para células mioepiteliales es útil para la confirmación del carácter infiltrante y su medida.
- Tras tratamiento neoadyuvante se añade el calificador "y", se debe realizar en una combinación de los datos macroscópicos y microscópicos. En general, si hay regresión la lesión muestra múltiples focos en la periferia del lecho tumoral (con edema, fibrosis y proliferación vascular), entonces se sigue la regla general del mayor foco continuo y el calificador "m".

Grado histológico

El grado histológico proporciona una información pronóstica muy importante. Su utilización requiere la estricta adhesión a los protocolos aceptados. El método fue descrito inicialmente por Elston y Ellis(1991). Para su evaluación se estudian tres elementos de la morfología tumoral: la formación de túbulos/acinos/ formación glandular; atipia nuclear/pleomorfismo y el número de mitosis. Todos los subtipos de carcinomas pueden ser graduados mediante este sistema y ofrece información pronóstica en todos ellos. Cada rasgo morfológico se valora de 1 a 3. La suma resultante define los tres grados.

- Grado 1: 3-5
- Grado 2: 6-7
- Grado 3: 8-9

Formación de túbulos: Se debe valorar toda la extensión tumoral para establecer semicuantitativamente la proporción de tumor con formación de lúmenes. Se evalúa con bajo aumento.

1. >75% del tumor forma túbulos
2. 10 -75% del tumor forma túbulos
3. >10% del tumor forma túbulos

Atipia nuclear/pleomorfismo: Se evalúa en la periferia y así se equilibra el efecto del margen de crecimiento y de las zonas centrales menos activas. Se reserva el 1 para los tumores con células pequeñas de aspecto inocente, y el score 3 para los casos con atipia obvia.

1. Núcleos de tamaño ligeramente superior a la célula ductal normal, cromatina uniforme, mínima variación de tamaño. Se considera de 1.5 o 2 veces el diámetro del eritrocito/célula ductal normal
2. Moderada variación del tamaño nuclear. Diámetro nuclear entre 2 y 3 veces el diámetro de un eritrocito o célula ductal normal
3. Marcada variabilidad en el tamaño nuclear, y un diámetro que supera más de 3 veces en de un eritrocito/célula ductal normal

Mitosis: La medida precisa del número de mitosis requiere una correcta fijación del tejido tumoral. El número total se contabiliza en 10 campos de gran aumento (x40). El tamaño de esta extensión varía en función de la apertura del campo del microscopio. Para ello se utilizan tablas donde debemos localizar las características de nuestro microscopio para determinar las mitosis que corresponden a cada score. Se debe realizar el conteo en la periferia del tumor donde la actividad proliferativa es mayor y las zonas más activas detectadas con poco aumento. Si hay áreas con diferente actividad, buscar las zonas más semejantes y con más mitosis. Si el numero obtenido está muy próximo al límite del score, contar algunos campos más para

determinar con más precisión el score correspondiente. Solo contabilizar las imágenes claras de mitosis, y descartar las figuras dudosas con apoptosis u otros artefactos.

Carcinoma in situ asociado

La asociación de carcinoma infiltrante con carcinoma in situ aumenta el riesgo de recidiva local y de afectación de márgenes, en mujeres que se tratan con cirugía conservadora. Es importante reflejar en el informe las características del componente in situ cuando éste es predominante (carcinoma microinfiltrante-carcinoma infiltrante con extenso componente intraductal).

El Carcinoma infiltrante con extenso componente intraductal se define como:

1. Cuando el componente in situ supone más del 25% de la superficie total de la lesión (infiltrante + in situ)
2. Cuando se trata de un carcinoma in situ extenso con un pequeño carcinoma infiltrante.

Invasión linfovascular

Es importante resaltar si existe o no invasión linfovascular, porque se considera un rasgo de mal pronóstico, que aumenta el riesgo de recidiva y reduce la supervivencia. Resulta difícil diferenciar la invasión linfovascular del artefacto de retracción. Este último depende de la calidad de la fijación y también del grado del tumor (mayor retracción en carcinomas grado 3).

Algunos datos pueden ayudar a la precisión de su diagnóstico:

- El espacio en que están inmersas las células tiene un anillo de endotelio.
- El espacio ocupado por tumor se halla próximo a otros canales vasculares.
- Presencia de hematíes o linfocitos en la luz además de los trombos tumorales.
- La forma del espacio es igual al del trombo en caso de artefacto de retracción y es diferente en caso de invasión linfovascular.
- Utilizar una inmunotinción para D2-40, o mejor CD31(que marca más intenso)

Márgenes

El establecimiento de los márgenes es de gran importancia sobre todo en las piezas de resección parcial, y su estudio histológico correcto depende del tallado minucioso y de una correcta orientación de la pieza. Todos los márgenes deben ser estudiados para descartar su afectación por tumor (10). En el informe debe reseñarse si hay algún borde afecto y la distancia al más próximo. Resulta necesario definir además la distancia del tumor hasta los diferentes márgenes.

Se define un margen como *positivo* si la tinta se posiciona sobre el carcinoma. Puede ser útil reflejar en el informe la *extensión* del margen afecto:

- Focal: 1 zona de <4mm
- Moderado: 2 o más zonas afectadas
- Extensa: en una extensión superior a 5mm

Tras la publicación reciente del consenso alcanzado por la Sociedad Americana de Cirugía y la Sociedad Americana de Oncológica Radioterápica sobre los bordes quirúrgicos, para cirugía conservadora y radioterapia de toda la mama (WBRT), se excluye de la recomendación pacientes tratadas con irradiación parcial. Precisan que:

- La amplitud o anchura del margen negativo no reduce el riesgo de recidiva local.
- En las pacientes que no reciban terapia sistémica, no hay evidencia de que sea necesaria mayor amplitud de los márgenes.
- No se recomienda márgenes más amplios (que sin tinta) en función de los subtipos moleculares.
- No están indicados márgenes más amplios en carcinoma lobulillar.
- Carcinoma lobulillar in situ en el borde no es indicación de re-escisión.
- La indicación en caso de carcinoma in situ pleomórfico no puede realizarse por el momento (series pequeñas, retrospectivas, pocos eventos..).

- No hay evidencia de que la amplitud de los márgenes reduzca el riesgo de recidiva local en pacientes jóvenes (<40 años).

Afectación de piel y músculo

La afectación de piel y músculo en la pieza de resección debe ser incluido en el informe, ya que forma parte del sistema de estadificación TNM, y es importante para la planificación del tratamiento.

La piel puede verse afectada de los siguientes modos:

- infiltración de la epidermis: enfermedad de Paget del pezón.
- Infiltración directa de la dermis sin ulceración.
- Infiltración de la dermis con ulceración, que se clasifica como pT4b.
- Nódulos cutáneos satélites, que se clasifica como pT4b.
- Infiltración linfovascular dérmica, si se asocia con clínica de carcinoma inflamatorio se clasifica como pT4d.

La presencia de *músculo* en la pieza quirúrgica supone que el margen profundo ha atravesado la fascia del pectoral. Si el músculo aparece infiltrado por tumor debe ser descrito en el informe pues constituye indicación de radioterapia postoperatoria.

Respuesta al tratamiento neoadyuvante

La respuesta al tratamiento adyuvante es un factor pronóstico importante para determinar el tiempo libre de enfermedad y la supervivencia global. El sistema AJCC de estadificación añade el prefijo "y" antes el calificador pT, para reflejar esta contingencia.

La mayor parte de los factores predictivos del tumor (grado, tamaño, tipo histológico, RE, RP, Ki-67 y Her2) se presentan muy alterados por el efecto de la quimioterapia, por lo que se recomienda considerar como definitivos los estudiados en la biopsia con aguja gruesa. Se recomienda repetir la evaluación de RE, PR y Her 2 tras la neoadyuvancia (CAP) repetir la evaluación de Her2 tras la neoadyuvancia.

Existen varios sistemas de evaluación de respuesta, entre los más destacados el propuesto por la misma AJCC, el propuesto por Millar-Payne y más recientemente el de Pinder.

Respuesta al tratamiento del tumor: La comparación con la biopsia previa a veces no es posible y esta medida resulta muy subjetiva

1. Respuesta histopatológica completa, si no hay:
 - Carcinoma residual
 - No hay carcinoma infiltrante residual pero hay carcinoma in situ.
2. Respuesta parcial, si:
 - Mínima enfermedad residual / mínimo resto de tumor (< 10% de tumor residual)
 - Evidencia de respuesta al tratamiento, tumor residual de entre 10–50%
 - > 50% de la celularidad del tumor persiste, cuando se compara con la biopsia previa, aunque son evidentes las modificaciones por el tratamiento.
3. Sin evidencia de respuesta.

Respuesta al tratamiento de los ganglios linfáticos:

1. Sin evidencia de metástasis y sin cambios por tratamiento.
2. Sin evidencia de metástasis, pero cambios evidentes por el tratamiento (fibrosis, necrosis).
3. Metástasis presentes pero cambios evidentes por el tratamiento.
4. Metástasis presentes, sin cambios evidentes por el tratamiento.

ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO DE LOS GANGLIOS LINFÁTICOS

Los ganglios linfáticos se estudian en la mayoría de las pacientes con carcinoma de mama. Su estudio (ganglios axilares y ganglios de mama interna) se realiza con el objetivo de la estadificación, pues su afec-

tación por el carcinoma es el indicador pronóstico más potente para determinar la indicación de tratamiento sistémico adyuvante. Los tipos de ganglios analizados son:

- Ganglios centinela (ver apartado ganglio centinela).
- Ganglios axilares (ver apartado pieza de linfadenectomía)
- Ganglios intramamarios
- Ganglios de mamaria interna, supraclaviculares, infraclaviculares.

Preparación y tallado de la pieza de linfadenectomía:

Puede ser remitida como pieza aislada o como parte de una resección parcial o mastectomía radical modificada. La pieza no precisa ser marcada con tinta, y debe ser incluida en formol. La búsqueda de ganglios debe realizarse sobre el tejido fijado, y utilizando la inspección y la palpación. En ocasiones el cirujano puede marcar la pieza en los tres niveles ganglionares de la axila o simplemente marcar el apex o la cola de la pieza. En el momento del tallado:

- Se deben incluir todos los ganglios aislados.
- Los ganglios que resultan macroscópicamente positivos, deben ser medidos. Se debe incluir las zonas que sugieran desbordamiento capsular y las zonas de afectación macroscópica en la grasa (se consideran como ganglios).
- Los ganglios macroscópicamente negativos:
 - a) Método estándar mínimo:
 - Todos los ganglios linfáticos identificados deben ser examinados histológicamente.
 - El método deberá garantizar que el número total de los ganglios debe ser evaluado; esto requiere un mínimo examen de al menos un corte de tejido de cada ganglio
 - Este estándar mínimo permite el examen de múltiples ganglios linfáticos como bloques compuestos.
 - a) Metodología ideal:
 - El objetivo es detectar las metástasis de más de 2mm (macrometástasis), para ello los ganglios deben ser cortados en lonchas finas. Y todas las lonchas deben ser estudiadas con al menos un corte de H-E.

Informe de la afectación ganglionar

El informe debe incluir:

- Número total de ganglios estudiados, se contabilizan los ganglios centinelas, axilares no centinelas, y los intramamarios. Si la suma de los centinelas y no centinelas es menor de 6 se utiliza el modificador "sn".
- Tamaño de las metástasis:
 - **Grupo celular aislado:** menor de 0,2mm o menos de 200 células. Se considera pN0. Si se utilizan técnicas complementarias (HE o IHQ) para su detección se añade pN0 (i+). No se cuentan para el número total de ganglios afectados por tumor.
 - **Micrometástasis:** miden entre 0,2 y 2 mm, o más 200 células. Si todos los ganglios presentan micrometástasis se añadirá el sufijo "mi"(pN1mi)
 - **Macrometástasis:** miden más de 2mm(pN1)

Como medir las metástasis:

- Si hay varias en un ganglio medir solo la de mayor tamaño.
- Si la ocupación del ganglio es en forma de células aisladas (carcinoma lobulillar) hasta 200 células será grupo celular aislado, y más será micrometástasis.
- La extensión extracapsular se incluye en la medida del tamaño de la metástasis.
- Los depósitos de tumor en la grasa periganglionar se contabilizan como ganglios, siempre que no se acompañe de parénquima no tumoral o carcinoma in situ (porque entonces se considera tejido mamario ectópico infiltrado)

BIBLIOGRAFIA

1. Varma S1, Ozerdem U, Hoda SA Complexities and challenges in the pathologic assessment of size (T) of invasive breast carcinoma. *Adv Anat Pathol*. 2014 Nov; 21(6):420-32.
2. Lakhani, S.R., Ellis. I.O., Schnitt, S.J., Tan, P.H., van de Vijver, M.J. WHO Classification of Tumours, Volume 4 IARC WHO Classification of Tumours, No 4
3. European guidelines for quality assurance in breast cancer screening and diagnosis. Fourth Edition Supplement. Editor C.A. Wells. Further information on the European Union Public Health Programme is available at: http://ec.europa.eu/health/index_en.htm ISBN 978-92-79-32970-8. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Union, 2013
4. Ellis IO1, Humphreys S, Michell M, Pinder SE, Wells CA, Zakhour HD; UK National Coordinating Committee for Breast Screening Pathology; European Commission Working Group on Breast Screening Pathology. Best Practice No 179. Guidelines for breast needle core biopsy handling and reporting in breast screening assessment. *J Clin Pathol*. 2004 Sep;57(9):897-902.
5. Pathology reporting of breast disease A Joint Document Incorporating the Third Edition of the NHS Breast Screening Programme's Guidelines for Pathology Reporting in Breast Cancer Screening and the Second Edition of The Royal College of Pathologists' Minimum Dataset for Breast Cancer Histopathology. NHSBSP Publication No 58 January 2005.
6. European guidelines for quality assurance in breast cancer screening and diagnosis Fourth Edition. Further information on the Health & Consumer Protection Directorate-General is available at http://europa.eu.int/comm/dgs/health_consumer/index_en.htm
7. Protocol for the Examination of Specimens From Patients With Invasive Carcinoma of the Breast. Protocol applies to all invasive carcinomas of the breast, including ductal carcinoma in situ (DCIS) with microinvasion. Based on AJCC/UICC TNM, 7th edition. Protocol web posting date: December 2013.
8. Ogston KN, Miller I, Payne S, Hutcheon WA, Sarkar TK, Heys DS (2001). A novel grading system to assess pathological response and predict survival in patients receiving primary chemotherapy for breast cancer. *Eur. J. Cancer*, 37:27.
9. Pinder SE, Provenzano E, Earl H, Ellis IO (2007). Laboratory handling and histology reporting of breast specimens from patients who have received neoadjuvant chemotherapy. *Histopathology*, 50:409–417.
10. M S. Moran, J. Schnitt, A E. Giuliano, JR. Harris, SA. Khan, J Horton, S Klimberg, MChavez-MacGregor, G Freedman, N Houssami, P L. Johnson , M Morrow. Society of Surgical Oncology–American Society for Radiation Oncology Consensus Guideline on Margins for Breast-Conserving Surgery With Whole-Breast Irradiation in Stages I and II Invasive Breast Cancer. *JCO* February 10, 2014 JCO.2013.53.3935.
11. Byrd, D.R., Compton, C.C., Fritz, A.G., Greene, F.L., Trotti, A The AJCC Cancer Staging Manual and Handbook,. (Eds.) 7th ed. 2010

Estudio del Ganglio Centinela en cáncer de mama. Implicaciones pronósticas y terapéuticas

Laia Bernet.

Hospital Lluís Alcanyís. Xàtiva

I. INTRODUCCIÓN

El estado de la linfadenectomía axilar(LA) sigue siendo el factor pronóstico más importante en cáncer de mama y la biopsia selectiva del ganglio centinela (BSGC), el método de elección para evaluarla en pacientes de cáncer de mama sin evidencia clínica de metástasis axilar.

Desde las primeras descripciones de la BSGC a principio de los 90 hasta la actualidad, se ha descrito gran número de protocolos para el estudio del ganglio centinela (GC), tanto basados en la citología como en el estudio histológico o molecular¹⁻⁴. Aunque hay acuerdo en que el número de metástasis diagnosticadas aumenta con la exhaustividad del método, la falta de homogeneidad en los distintos protocolos citológicos e histológicos ha dificultado la obtención de datos pronósticos concluyentes. En la última década, el desarrollo de nuevas técnicas moleculares ha permitido no sólo alcanzar la imprescindible estandarización diagnóstica sino también mejorar la individualización terapéutica de la axila, tanto en el ámbito quirúrgico como en el de la radioterapia.

La tendencia cada vez más conservadora en el tratamiento del cáncer de mama ha cuestionado, especialmente a partir del ensayo Z0011⁵, la necesidad de la BSGC. Sin embargo, el diagnóstico del GC sigue siendo el pilar fundamental para la individualización terapéutica de la axila en cáncer de mama⁶.

II. ESTUDIO CITOLÓGICO

Procedimiento

El procedimiento estándar intraoperatorio consiste en la bi-disección del GC por su eje mayor. De cada superficie de corte, se realiza una impronta que se seca al aire y se tiñe con una solución de Diff-Quik (Baxter Diagnostics, McGaw Park, IL) para examen microscópico inmediato.

Las categorías diagnósticas más comúnmente usadas son: "negativo, sospechoso, atípico o positivo para metástasis". Un diagnóstico "positivo para metástasis" implica la linfadenectomía axilar. El tiempo medio hasta la emisión del informe oscila entre 10 y 20 minutos. En todos los casos, el ganglio restante debe ser evaluado en secciones histológicas, en un segundo tiempo, para diagnóstico definitivo.

Sensibilidad y Especificidad

La sensibilidad del procedimiento es bastante baja y varía en función de la experiencia del patólogo, del tipo histológico de tumor y del diámetro de la metástasis, siendo mayor para las macrometástasis que para las micrometástasis y para el carcinoma ductal que para el carcinoma lobulillar⁷.

Indicaciones

A pesar de que la citología por impronta no suele ser el método recomendado por su baja sensibilidad, puede ser una opción diagnóstica, especialmente en los siguientes contextos:

1. Para tener datos morfológicos cuando se aplica el protocolo molecular One Step Nucleic Acid Amplification (OSNA)
2. Para la confirmación diagnóstica de metástasis cuando son evidentes macroscópicamente, especialmente si el número de muestras excede la capacidad técnica del equipo de diagnóstico molecular RD-100i para diagnóstico intraoperatorio
3. Si no es posible realizar otro tipo de estudio (molecular ni histológico).

III. ESTUDIO HISTOLÓGICO

El sistema de estadificación TNM-6^a ed⁸, basándose en el diámetro tumoral como factor pronóstico, medido en mm sobre la sección de Hematoxilina-Eosina (HE), clasificó las metástasis en tres tipos distintos:

- <0,2mm (células tumorales aisladas, CTA),
- >0,2 ≤ 2mm (micrometástasis)
- >2mm (macrometástasis).

Estos límites fueron hasta cierto punto arbitrariamente establecidos, su reproducibilidad es escasa, especialmente para las metástasis de menos de 1mm y su valor predictivo para metástasis en otros ganglios no-centinela no ha sido bien definido. Dado que tanto los precedentes históricos como los estudios de seguimiento indican que son las metástasis >2mm las que tienen mayor impacto pronóstico, la mayoría de protocolos histopatológicos fueron dirigidos a asegurar el diagnóstico de, por lo menos, las macrometástasis¹⁻³.

Procedimiento

Debe inspeccionarse macroscópicamente el ganglio y la grasa que eventualmente le rodea. Si existe evidencia macroscópica de tumor, pueden ser suficientes una o varias secciones para su diagnóstico y el de su posible extensión a la grasa peri-ganglionar. Datos anatómicos apoyan que la sección del ganglio por el eje mayor evidencia mayor número de aferentes linfáticos al seno sub-capsular, por lo que, en ausencia de tumor macroscópico, debe seccionarse el ganglio siguiendo la dirección de su eje mayor en secciones que, en ningún caso, deben ser > 2mm a fin de no obviar el diagnóstico de las macrometástasis.

La inclusión de las secciones obtenidas debe permitir el estudio de la máxima extensión posible de las superficies de corte ganglionar. El objetivo debe ser evitar que queden secciones de más de 2mm sin estudiar, aunque, en la práctica diaria, es difícil de conseguir^{4,5}.

Sensibilidad y Especificidad

Aunque la especificidad del estudio histológico oscila alrededor del 99%, la sensibilidad oscila entre el 40 y el 80%, especialmente para las metástasis <2mm que pueden ser difíciles de diagnosticar en cortes intraoperatorios, generalmente de peor calidad que los de parafina y, especialmente, en carcinomas lobulillares¹¹. Como ayuda al diagnóstico y con el fin de aumentar su sensibilidad, se propuso completar el estudio histopatológico del GC con técnicas inmunohistoquímicas (IHQ) para citoqueratina u otros marcadores epiteliales¹². Sin embargo, el gran número de cortes requeridos así como la dudosa coste-efectividad de las técnicas IHQ intraoperatorias han limitado su uso y aplicación.

Como limitaciones importantes del estudio histológico, cabe destacar la falta de reproducibilidad debida al gran número de esquemas de trabajo descritos y a la subjetividad inherente al sistema de medida. Otra limitación consiste en que sólo es posible la evaluación de la medida de la metástasis en dos planos sobre el corte histológico, no pudiéndose obtener, por las limitaciones inherentes al método, la evaluación precisa del volumen tumoral total.

Indicaciones

En ausencia de OSNA, el estudio de secciones seriadas de 2mm (HE) para estudio histológico es el método de elección para el diagnóstico del GC. Es aceptable recurrir también al estudio histológico en caso de que, aún disponiendo de OSNA, el número de GC recibidos o el peso de los mismos exceda, por las posibilidades del equipo, el tiempo recomendado para diagnóstico intraoperatorio.

IV. ESTUDIO MOLECULAR

El método recomendado tanto en guías nacionales como internacionales para el estudio intraoperatorio del GC es el método molecular OSNA™ (One Step Nucleic Acid Amplification™) (Sysmex)¹³⁻¹⁵.

Bases técnicas

OSNA es una técnica desarrollada en Japón en el año 2000 cuyo fundamento consiste en una PCR mediada por bucles (LAMP) diseñada para la amplificación del ARNm de la Citoqueratina 19 (ARNm-CK19). El ARNm-CK19 fue seleccionado como marcador de elección después de haber sido comparado con otros 45 marcadores por ser el que mostró mejor capacidad de discriminar entre ganglio metastásico y no metastásico¹⁶.

La cuantificación del número de copias de ARNm-CK19 se basa en la medida de la turbidez generada por el pirofosfato de magnesio liberado en la reacción de amplificación, de escasa solubilidad en medio acuoso y que precipita cuando su concentración alcanza la saturación¹⁸. La turbidez de la reacción, medida cada 6s, permite monitorizar la amplificación de ARNm-CK19¹⁸. El rise-time es el tiempo que tarda en producirse un valor de turbidez de 0,1 en la muestra y se correlaciona con la cantidad de ARNm-CK19 que, a su vez, se correlaciona con el número de células tumorales y, por tanto, con el volumen de la metástasis.

La correlación entre el número de copias de ARNm-CK19 y el tamaño de la metástasis (criterios Sistema de EstadificaciónTNM-6ªed⁸) se determinó por análisis estadístico de la distribución logarítmica normal del número de copias obtenido del estudio OSNA de 106 ganglios linfáticos, 42 de los cuales histológicamente negativos de pacientes pN0, 42 histológicamente negativos de pacientes pN1-3 y 22 ganglios histológicamente positivos¹⁹. El punto de corte más bajo (L) se obtuvo por medio del análisis estadístico de los resultados OSNA de los ganglios histológicamente negativos de pacientes pN0. El equipo permite visualizar simultáneamente las curvas de amplificación en tiempo real de cada una de las muestras analizadas y expresa el número de copias de ARNm-CK19 tanto en números logarítmicos como de forma semi-cuantitativa (L+, +, +++, correspondientes a CTAs, micro y macrometástasis respectivamente).

De este modo:

- **La macrometástasis (H)** se define por el número de copias de ARNm-CK19 contenidas en un bloque de tejido tumoral de 2µl, correspondiente a **más de 5.000 copias** y se expresan como (++)
- **Micrometástasis:** valores comprendidos entre L y H, es decir, **entre 250 y 5.000 copias/µl**, y se expresan como (+).
- **Negativos :** Se consideran los valores inferiores a L, es decir, **< 250 copias**,
- **Células Tumorales aisladas (CTA)** se consideran aquellos casos identificados como negativos por el sistema **pero con un número de copias entre 100 y 250** copias aparecen, referidos en el equipo de amplificación como (-) L,

En conjunto, las principales ventajas de la RT-LAMP, frente a otros tipos de PCR, son:

- Alta eficiencia bajo condiciones isotermas sin **evidencia de co-amplificados distintos al ADN diana**
- Alta especificidad para las secuencias diana. Ello evita en gran parte los problemas de back-ground, frecuentes en cualquier reacción de amplificación de ácidos nucleicos.
- Procedimiento simple y sencillo de utilizar en cualquier laboratorio si se dispone del kit de amplificación adecuado
- Combinada con reacciones de transcripción reversa, LAMP identifica cualquier secuencia de ARNm de manera altamente eficiente.

Aplicación clínica

OSNA es un procedimiento estandarizado con alta sensibilidad (82,7-98,2%) y especificidad (94,8-97,7%) que elimina la variabilidad entre observadores y permite el diagnóstico intraoperatorio del GC en su totalidad, evitando la necesidad de linfadenectomías diferidas en un segundo tiempo^{4,20}.

OSNA puede aplicarse igualmente al estudio diferido de la linfadenectomía axilar. Bernet et al. compararon el diagnóstico histológico vs OSNA de 567 ganglios procedentes de linfadenectomía axilar observando que el 47% de las pacientes clasificadas como pN0 en el estudio histológico fueron metastásicas por OSNA. El 88,6% de los ganglios metastásicos OSNA no fueron detectados en el estudio convencional y, de ellos, el 35,8% fue macrometastásico²⁰.

Recientemente, se ha introducido el concepto de “Carga Tumoral Total” (CTT), aplicable al estudio molecular del GC, definido como la suma del número de copias de ARNm-CK19 de cada uno de los GC. Algunos autores, basándose en el estudio molecular del GC, relacionan la “Carga Tumoral Total” (CTT) con el número de ganglios metastásicos de la linfadenectomía axilar y concluyen que la CTT es el mejor predictor independiente de metástasis en los ganglios no-centinela de la LA^{21,22}. La variable CTT constituye una herramienta de gran impacto clínico al facilitar la toma de decisiones terapéuticas sobre la axila durante el acto quirúrgico y permite definir distintos puntos de corte, en función de la sensibilidad y especificidad deseadas, tanto para la afectación (metástasis sí/no) de ganglios no-centinela como para la predicción del número de ganglios axilares no-centinela metastatizados. La CTT, además, mejora el valor predictivo positivo de los nomogramas clínicos conocidos²¹⁻²³. Peg et al recomiendan un punto de corte de 15.000 copias para la indicación de la linfadenectomía axilar²².

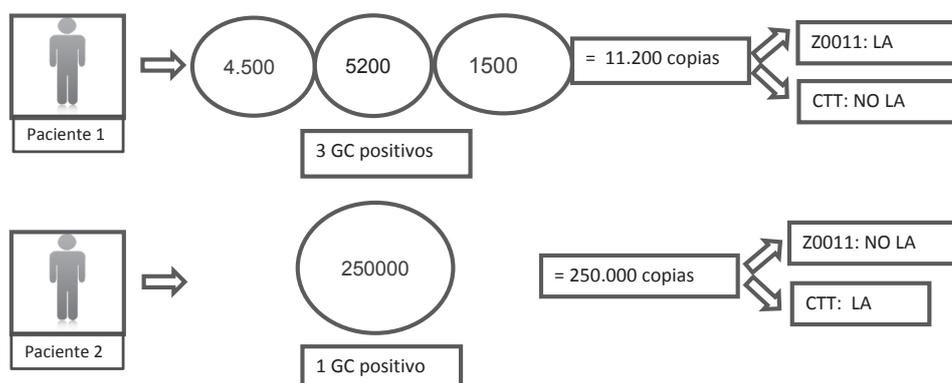


Fig1. Criterios para linfadenectomía axilar (LA), ensayo Z0011 vs carga tumoral total (CTT)

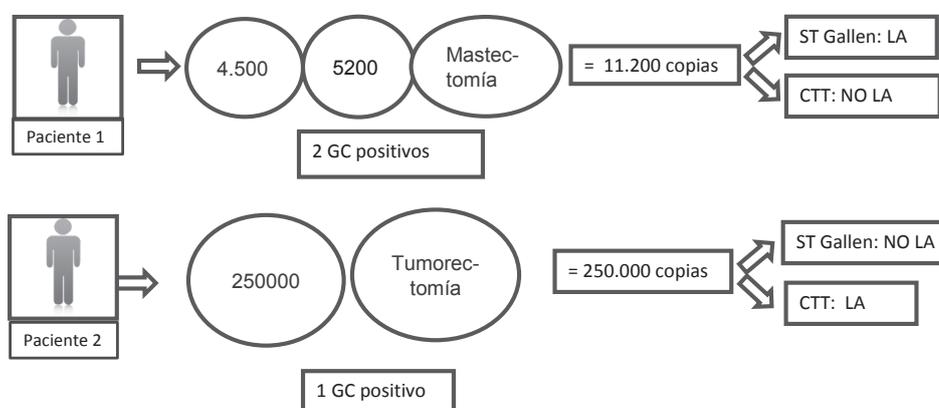


Fig 2. Criterios para LA, ST Gallen vs CTT

Desde el punto de vista quirúrgico, la aplicación diagnóstica de la CTT conlleva importantes cambios en la decisión terapéutica sobre la axila, tanto en relación a los criterios de St. Gallen como los del ensayo Z0011⁵ (Fig 1 y 2)

Desde el punto de vista del oncólogo radioterápico, la CTT, por su valor predictivo del número de ganglios axilares no-centinela metastásicos, constituye, en ausencia del estudio patológico de la linfadenectomía completa, el mejor criterio para individualizar el tratamiento radioterápico, al depender éste del número de ganglios afectados²³. En este contexto, la CTT constituye la única variable capaz de dar información acerca del estado de los ganglios axilares no-centinela. El ensayo OPTIMAL, promovido por el grupo GICOR y actualmente en curso, tiene como objetivo primario demostrar la no inferioridad de la irradiación incidental de los nódulos axilares, comparada con la intencional, en términos de supervivencia libre de enfermedad a 5 años (SLE) de pacientes con cáncer de mama temprano con afectación limitada del ganglio centinela, evaluada con OSNA (250 a 15.000 copias/uL), tratada con cirugía conservadora de la mama sin linfadenectomía axilar.

Algunos autores han especulado con la posibilidad de que los carcinomas de mama CK19 negativos pudieran ser causa de falsos negativos en el protocolo OSNA²⁴⁻²⁶. Aunque publicaciones recientes parecen indicar que, a pesar de la pérdida en la expresión de la proteína, se conserva la expresión de ARNm-CK19^{25,26}, el documento de Consenso 2013 para GC recomienda la evaluación inmunohistoquímica de la proteína en la biopsia de aguja gruesa (BAG) y excluir del protocolo OSNA los tumores con expresión de CK19 en menos del 30% de las células tumorales¹³.

Las inclusiones epiteliales benignas o el desplazamiento de células al GC desde el tumor primario, especialmente en los carcinomas papilares, pueden ser casusas de falsos positivos OSNA, aunque su escasa incidencia no constituye un problema real en la práctica clínica^{20,27}.

OSNA presenta, frente al estudio histológico, las siguientes ventajas:

1. Permite el estudio del GC en su totalidad sin pérdida de tejido y en tiempo asumible intra-operatoriamente
2. Cuantificación precisa y reproducible del volumen de la metástasis
3. Estandarización

Dado que el sistema de clasificación del TNM⁸ se basa exclusivamente en criterios histológicos, no aplicables al estudio molecular, el grupo de expertos para GC recomienda la siguiente nomenclatura para el diagnóstico de metástasis, protocolo OSNA¹³:

- Macrometástasis: pN1_(OSNA).
- Micrometástasis: pN1mic_(OSNA).
- Células tumorales aisladas: pN0 (mol+_{OSNA}).

BIBLIOGRAFÍA

1. Weaver DL. Pathology evaluation of sentinel lymph nodes in breast cancer: protocol recommendations and rationale. *Mod Pathol* 2010; 23: S26-S32
2. Lyman GH, Giuliano AE, Somerfield MK 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
3. Cserni G, Amendoeira I, Apostolikas N et al. Pathological work-up of sentinel lymph nodes in breast cancer. Review of current data to be considered for the formulation of guidelines. *Eur J Cancer* 2003;39: 1654-67.
4. Bernet L, Martínez Benaclocha M, Cano Muñoz R et al. Molecular Diagnosis of Sentinel Lymph Nodes for Breast Cancer: One Step Ahead for Standardization. *Diagn Mol Pathol* 2011;20:18-21
5. Giuliano AE, McCall L, Beitsch P 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 Z0011 randomized trial. *Ann Surg.* 2010;252: 426-32.

6. Donker M, van Tienhoven G, Straver ME et al. Radiotherapy or surgery of the axilla after a positive sentinel node in breast cancer (EORTC 10981-22023 AMAROS): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 non-inferiority trial. *Lancet Oncol.* 2014;15(12):1303-10
7. Cox C, Centeno B, Dickson D et al. Accuracy of Intraoperative Imprint Cytology for Sentinel Lymph Node Evaluation in the Treatment of Breast Carcinoma. *Cancer (Cancer Cytopathol)* 2005;105:13-20
8. TNM Classification of Malignant Tumors, 6th ed. In: Sobin LH, Wittekind C, eds. New York: Wiley-Liss; 2002
9. Weaver DL, Le UP, Dupuis SL et al. Metastasis detection in sentinel lymph nodes: Comparison of a limited widely spaced (NSABP protocol B-32) and a comprehensive narrowly spaced paraffin block sectioning strategy. *Am J Surg Pathol* 2009; 33:1583-1589
10. ADASP Recommendations for Processing and Reporting of Lymph Node Specimens Submitted for Evaluation of Metastatic Disease. *Mod Pathol.* 2001 Jun;14(6):629-32
11. Cipolla C, Cabibi D, Fricano S et al. The value of intraoperative frozen section examination of sentinel lymph nodes in surgical management of breast carcinoma. *Langenbecks Arch Surg.* 2010;395(6):685-9
12. Wong SL, Chao C, Edwards MJ et al. The use of cytokeratin staining in sentinel lymph node biopsy for breast cancer *Am J Surg* 2001;182 (4):330-4.
13. Bernet L, Piñero A, Vidal-Sicart S et al. Consenso sobre la biopsia selectiva del ganglio centinela en el cáncer de mama. Revisión 2013 de la Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria. *Rev Esp Patol.* 2014;47:22-32
14. National Institute for Health and Care Excellence. Diagnostics consultation document. Intraoperative tests (RD-100i OSNA system and Metasin test) for detecting sentinel lymph node metastases in breast cancer. London: NICE; 2013. Disponible en <http://guidance.nice.org.uk/DT/InDevelopment>
15. The Japanese Breast Cancer Society. Clinical practice guideline of breast cancer. Is the sentinel lymph node analysis recomendable? *CQID.* 2013;1:601401.
16. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H et al. Loop mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28:E63.
17. Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes* 2002;16:223-9.
18. Mori Y, Nagamine K, Tomita N et al. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;289:150-4.
19. 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.
20. Bernet L, Cano R, Martinez M, et al. Diagnosis of the sentinel lymph node in breast cancer: a reproducible molecular method: a multicentric spanish study. *Histopathology* 2011;58:863-9.

21. Ohi Y, Umekita Y, Sagara Y et al. Whole sentinel lymph node analysis by a molecular assay predicts axillary node status in breast cancer. *Br J Cancer*. 2012;107:1239-43.
22. Peg V, Espinosa-Bravo M, Vieites B et al. Intraoperative molecular analysis of total tumor load in sentinel lymph node: a new predictor of axillary status in early breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;139:87-93.
23. Piñero-Madróna A, Ruiz-Merineo G, Bernet L et al. Tumoral load quantification of positive sentinel lymph nodes in breast cancer to predict more than two involved nodes. "THE BREAST-D-14-208R1" In press.
24. Vilardell F, Matias-Guiu X. CK19 expression should be tested prior to OSNA analysis of sentinel lymph nodes in breast cancer. *Virchows Arch*. 2013;462:121.
25. Alvarenga CA, Paravidino PI, Alvarenga M et al. Expression of CK19 in invasive breast carcinomas of special histological types: implications for the use of one-step nucleic acid amplification. *J Clin Pathol*. 2011;64:493-7.
26. 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
27. Maiorano E, Mazzarol GM, Pruneri G et al. Ectopic breast tissue as a possible cause of false-positive axillary sentinel lymph node biopsies. *Am J Surg Pathol*. 2003;27:513-8

Estudios y recomendaciones de biomarcadores en cáncer de mama

Ángel Panizo ⁽¹⁾, Jesús Javier Sola ⁽²⁾

(1) Complejo Hospitalario de Navarra, Pamplona

(2) Hospital San Pedro, Logroño

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea y compleja, caracterizada por la diversidad molecular y genética, que ha dado como resultado el reconocimiento de varios subtipos moleculares diferentes de tumores. El cáncer de mama se puede dividir en 4 subtipos intrínsecos: luminal A, luminal B, HER2 enriquecido, y de tipo basal. Los perfiles de expresión génica para clasificar el cáncer de mama son de utilidad muy limitada en la práctica clínica diaria, en parte debido a los costes y al consumo de mucho tiempo. Por eso, se ha propuesto el uso de paneles de inmunohistoquímica para la clasificación de los tumores de mama en distintos subtipos identificados por los estudios de perfiles de expresión génica. Estos paneles utilizan principalmente anticuerpos contra los receptores de estrógenos (RE), receptores de progesterona (RP), receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2) y Ki-67.

I. GENERALIDADES

Se recomienda que el estudio de los receptores hormonales, HER2 y Ki-67 se haga en todos los carcinomas de mama primarios y en recidivas o tumores metastásicos. Si los receptores hormonales y HER2 son negativos en la biopsia de aguja gruesa, se debe considerar repetir la prueba en una muestra subsiguiente, sobre todo cuando los resultados son discordantes con los hallazgos histopatológicos. Cuando hay varios focos de carcinoma infiltrante, se debe realizar el estudio de biomarcadores en el de mayor tamaño, así como en los focos más pequeños si son de diferente tipo histológico o grado superior.

En cada prueba, se deben tener en cuenta las variables preanalíticas y analíticas específicas que puedan afectar a los resultados. Tales variables incluyen:

- *Tiempo de isquemia fría* (tiempo entre la extracción de tejido y el inicio de la fijación) y el tiempo de fijación: el tejido debe fijarse en formol tan pronto como sea posible una vez tomada la muestra. La fijación puede mejorarse mediante la colocación en fijador de una loncha delgada del tumor separada de la muestra principal.
- *Tipo de fijador*: la muestra debe fijarse en formol neutro tamponado al 10% durante 24 horas. La fijación durante 24 horas logra resultados óptimos para muestras pequeñas (biopsias de aguja) y muestras más grandes (piezas quirúrgicas). Tiempos de fijación cortos (por ejemplo <6-8 horas) pueden poner en peligro los resultados del estudio de receptores hormonales. La IHQ de receptores hormonales puede verse comprometida por la fijación en formol caliente o fijadores distintos a formalina tamponada al

10%. La inmunorreactividad también puede verse afectada por fijación prolongada con formol (posiblemente sólo con tiempos de fijación extremos).

- *Tratamiento del tejido que pueda alterar potencialmente la inmunorreactividad* (por ejemplo, descalcificación).

II. CONTROLES IHQ

Deben incluirse controles externos e internos positivos y negativos. Se recomienda la selección de controles positivos con ambos niveles bajos y altos, con el fin de evitar resultados falsos negativos.

- *Control Interno*: al seleccionar el bloque a estudiar se recomienda incluir uno que contenga tejido mamario no neoplásico adyacente al tumor, para proporcionar un control positivo interno que ha sufrido fijación similar al carcinoma.
- *Idoneidad de la muestra para la evaluación*: el análisis de receptores hormonales se puede realizar en material de biopsia incluido en parafina (incluyendo biopsias de aguja y tejidos extirpados), material citológico o bloques celulares. La evidencia actual publicada es inconsistente en cuanto a qué tipo de muestra obtiene los resultados más precisos en el análisis de receptores hormonales. Algunos estudios favorecen las biopsias de escisión, mientras que otros sugieren que las biopsias con aguja podrían proporcionar estimaciones más fiables en los receptores hormonales que la escisión biopsia o la mastectomía. El manejo óptimo de la muestra es probablemente el factor clave para garantizar estudios de IHQ precisos, independientemente del tipo de espécimen.
- *Clon de anticuerpo primario y métodos de recuperación antigénica*.
- *Garantía de calidad*: Hay muchas variables técnicas que pueden afectar a los resultados del estudio IHQ y por tanto, los estudios de IHQ deberán ser validados para asegurar su exactitud. Los controles de calidad externos son herramientas muy valiosas para ayudar a asegurar que los ensayos se realizan como se esperaba y los resultados de la técnica son por tanto comparables con otros laboratorios. Estos programas o controles de calidad de la técnica de IHQ están disponibles tanto en la SEAP, como en otras organizaciones.

III. ANÁLISIS DE RECEPTORES HORMONALES (RE y RP)

Las células epiteliales de la mama tienen RE y RP y proliferan bajo su influencia. La mayoría de los carcinomas de mama también expresan estos receptores y pueden ser estimulados para crecer por estas hormonas. La eliminación endógena de hormonas por ooforectomía o bloqueo farmacéutico (por ejemplo, con tamoxifeno o inhibidores de la aromatasa) puede retrasar o prevenir el crecimiento tumoral y prolongar la supervivencia.

El estado de los receptores hormonales se determina principalmente para identificar pacientes que pueden beneficiarse de terapia hormonal. Alrededor del 75% al 80% de los cánceres de mama invasivos son positivos para RE y RP. Los estudios han demostrado un beneficio de supervivencia sustancial en los pacientes con tumores RE positivos tratados con terapia hormonal.

El estado de los receptores hormonales se determina con mayor frecuencia en secciones de tejido fijado en formol e incluido en parafina, mediante técnicas de inmunohistoquímica (IHQ). Sólo la tinción nuclear se considera positiva. La tinción citoplasmática no se correlaciona con la respuesta tumoral a la terapia endocrina.

Los estudios de IHQ sugieren que los pacientes con niveles de receptores de hormonales superiores tienen una mayor probabilidad de respuesta a la terapia hormonal, pero la expresión tan baja como del 1% de tinción nuclear positiva se ha asociado con respuesta clínica. Por tanto, las guías recomiendan clasificar todos los casos con al menos 1% de células positivas con independencia de la intensidad de la tinción, como tumor receptor positivo. Este punto de corte representa un enfoque pragmático, en ausencia de consenso.

El Instituto Nacional de Salud (NIH) americano recomienda que el patólogo informe del porcentaje de células positivas y la intensidad de la tinción. En los pacientes con baja expresión de receptores hormonales

(1% a 10% de células débilmente positivas), la decisión sobre la terapia endocrina se debe basar en un análisis de sus riesgos y beneficios potenciales por parte del clínico.

Si sólo hay un pequeño número de células con tinción positiva débil, el ensayo debe repetirse. Ante la repetición de la prueba, el patólogo debe prestar mucha atención a la optimización de la recuperación antigénica, utilizar diferentes bloques, o utilizar una muestra diferente del mismo paciente (por ejemplo, la biopsia de aguja).

Cuantificación de RE y RP

Tanto ASCO como CAP han emitido recomendaciones para informar los resultados de IHQ para RE, RP. La práctica común en los laboratorios de patología es valorar la tinción de RE, RP, y Ki-67 visualmente (también llamado manualmente) mediante microscopía de luz con un aumento media (objetivos 10x o 20x).

Se debe estimar el porcentaje de núcleos teñidos (positivos). El número de células positivas se puede expresar como un porcentaje absoluto o dentro de un rango de categorías discretas.

La intensidad se refiere al grado de positividad nuclear de la tinción predominante. Se debe valorar como baja (1+), intermedia (2+) o alta (3+). La intensidad de la tinción se afecta por la cantidad de proteína presente, así como por el anticuerpo utilizado y por el sistema de recuperación antigénico empleado. En la mayoría de los carcinomas existe inmunorreactividad de intensidad heterogénea.

Hay dos métodos de cuantificación de RE y RP usando la combinación de la intensidad y el porcentaje de células positivas: score Allred y el score H. Los 2 sistemas clasifican los carcinomas en grupos, de forma similar, pero no idéntica. Si los anticuerpos se utilizan con sistemas de detección sensible o de amplificación de señal, la mayoría de los carcinomas caerán en grupo claramente positivo (puntuación 7 u 8) o claramente negativo (puntuación 0) según el score Allred. Un pequeño grupo de carcinomas (<1% del total) mostrará niveles intermedios de inmunorreactividad.

Las directrices ASCO/CAP recomiendan que los carcinomas con <1% de células positivas se informen como negativos para RE o RP. En el score Allred la supervivencia de los pacientes cuyos carcinomas han tenido una puntuación de 2 (correspondiente a <1% células débilmente positivas) es similar a la de los pacientes cuyos carcinomas son completamente negativos para RE. Por lo tanto, una puntuación de 2 se considera un resultado negativo. Los carcinomas con <1% de células positivas e intensidad de 2+ o 3+ tendrían una puntuación total de 3 o 4, y por tanto se consideran positivos.

Sea cual sea el método de valoración que se utilice, es bien sabido que la evaluación manual microscópica de RE y RP es subjetiva, tediosa, requiere mucho tiempo y por tanto puede conducir a variabilidad significativa entre observadores. Para superar estos problemas, se han descrito varios métodos de análisis de imagen digital. El análisis de imagen asistida por ordenador puede mejorar la precisión y reproducibilidad interobservador de las valoraciones de IHQ. Para llegar a ser ampliamente aceptado y utilizado por los patólogos, un sistema de análisis digital de imágenes debe ser de fácil acceso, no requerir un equipo dedicado o instalación de software, y ser compatible con las configuraciones de microscopio existentes. Para su uso rutinario, un sistema de análisis de imagen debe aceptar variación en la intensidad de la tinción, en la configuración de microscopio, y en los entornos de adquisición de imágenes

IV. ESTUDIO DE Ki-67

Ki-67 es una proteína nuclear que se encuentra en todas las fases del ciclo celular y por tanto, un marcador de proliferación celular. El gen que codifica la proteína Ki67 (MKI67), está localizado en el cromosoma 10q26, y comprende 15 exones con un gran exón 13, que incluye 16 secuencias homólogas que contienen un elemento de 22 aminoácidos altamente conservado llamado el "Ki67 motif". Los anticuerpos monoclonales usados más comúnmente son MIB1 y SP6.

La tinción IHQ para Ki67 es una técnica que está sujeta a un gran número de variables. De forma similar a RE, RP y HER2, la tinción de Ki67 requiere la optimización y la normalización de las condiciones técnicas. Una ventaja de IHQ para Ki67 es que es mucho más tolerante con las variables preanalíticas, que comúnmente

afectan a HER2, RE y RP. En particular, la fijación, que es con frecuencia un problema en otros ensayos de cáncer de mama y que puede incluso afectar recuento mitótico, es menos problemático para Ki67.

En la evaluación de la tinción es importante reconocer que la variación en la expresión de Ki67 se produce en todo el ciclo celular, que va desde tinción nuclear débil y en gránulos perinucleolares en fase G1, a tinción nucleolar y perinucleolar en G2 y tinción intensa cuando la membrana nuclear desaparece durante la mitosis. En consecuencia, a la hora de valorar la positividad de Ki67 se debe incluir todos los tipos de tinción nuclear, ya sea granular o difusa, y con independencia de la intensidad de la tinción. Las figuras mitóticas sirven como un buen control interno positivo para Ki67.

El porcentaje de células tumorales positivas para Ki-67 se utiliza a menudo para estratificar a los pacientes en grupos pronósticos. El cáncer de mama de tipo luminal que es RE+ se divide en tipos luminal A y luminal B, dependiendo de los valores del receptor de progesterona y del índice Ki-67. Hay una serie de características moleculares que tienden a ser diferentes entre el tipo luminal A y el tipo luminal B, pero la característica más obvia es una mayor tasa de proliferación en el segundo.

Sigue habiendo una falta de consenso sobre la metodología de cuantificación, la definición de baja versus alta expresión, un punto de corte adecuado para la positividad, o qué parte del tumor debe evaluarse (por ejemplo, borde de infiltración, "hot spots", promedio general, etc.).

Se ha empleado diferentes enfoques para la cuantificación de Ki67. Estos incluyen métodos de análisis de imágenes, que tienen la ventaja de la velocidad y la objetividad, pero puede subestimar el número de células no teñidas y pueden ser afectados también por la tinción de fondo, así como por la positividad en el infiltrado linfóide o en el estroma. Los métodos de valoración visual dan simplemente una estimación de la proporción de células teñidas. Un enfoque más robusto es llevar a cabo un recuento formal de células tumorales teñidas y no teñidas: idealmente se deben contar 1000 células (un mínimo de 500 células).

El mayor problema para una valoración fiable de Ki67 es la selección de los campos a estudiar, a causa de la variación causada por la heterogeneidad intratumoral. Un método consiste en seleccionar los 'puntos calientes' (hot-spots), que es análogo al enfoque adoptado en la clasificación de Bloom-Richardson, donde se analiza la zona más mitóticamente activa en la periferia del tumor, a la hora de evaluar la puntuación mitótica. Un enfoque alternativo pretende obtener una puntuación media representativa de todo el tumor mediante la selección de campos con una gama de patrones de tinción. Al emplear la puntuación media, se considera que ese valor refleja la naturaleza global de todo el tumor. Sin embargo, el uso de los puntos calientes ("hot spots"), parece que refleja mejor la porción más activa del tumor (clones tumorales que marcan el potencial biológico del tumor).

En vista de las diversas metodologías empleadas en la evaluación de Ki67 y la falta de consenso en cuanto a la cuantificación, puede ser prudente establecer un protocolo de informe de Ki67 en cada institución y luego revisar los datos locales para comprender el rango de valores visto a través de los grados y en las condiciones específicas.

V. HER2

Un subgrupo de los carcinomas de mama (aproximadamente 15% a 20%) sobreexpresan el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2). La sobreexpresión de la proteína es generalmente debido a la amplificación del gen. La amplificación del gen se correlaciona con la sobreexpresión de la proteína en aproximadamente el 95% de los casos. En un pequeño subconjunto de carcinomas (probablemente <5%), la sobreexpresión de la proteína se puede producir por diferentes mecanismos a la amplificación. La sobreexpresión es a la vez un factor pronóstico y predictivo. El estado de HER2 se evalúa principalmente para determinar que pacientes se pueden beneficiar de la terapia anti-HER2.

El estado de HER2 se puede determinar en el tejido mediante la evaluación de la expresión de la proteína en la membrana de las células tumorales utilizando IHQ o mediante la evaluación del número de copias del gen HER2 utilizando hibridación in situ (ISH). Se debe tener en cuenta que en un pequeño número de

casos, puede haber sobreexpresión de la proteína sin amplificación, amplificación sin sobreexpresión de la proteína, o marcada heterogeneidad intratumoral.

El estudio de HER2 debe realizarse en todos los carcinomas infiltrantes de mama, en enfermedad recidivante o en metástasis.

Pruebas de HER2 por inmunohistoquímica

Se recomienda que el tejido se fije en formol tamponado al 10% durante al menos 6 horas.

Los resultados falsos positivos para HER2 en IHQ pueden deberse a:

- *Artefacto del borde*: se ve generalmente en las biopsias de aguja, donde las células cerca de los bordes se tiñen más fuerte que en el centro de la biopsia. Las biopsias con tinción más intensa en el borde del tejido deben ser interpretadas con cautela.
- *Positividad citoplasmática*, que puede oscurecer la tinción de membrana y dificultar la interpretación.
- *Sobretinción* (fuerte tinción de la membrana de las células epiteliales normales). Puede ser debido a la inadecuada concentración del anticuerpo (concentración demasiado alta).
- *Valoración de carcinoma ductal in situ (CDIS)*: CDIS es a menudo HER2 positivo. En los casos con extenso CDIS, se debe valorar HER con cautela, evitando las áreas de CDIS y valorando sólo el componente invasivo.

Resultados de IHQ falsos negativos para HER2 pueden deberse a:

- Tiempo de isquemia fría prolongada.
- Heterogeneidad del tumor.
- Concentración inadecuada del anticuerpo (concentración demasiado baja)

Los resultados falsos negativos y falsos positivos pueden reducirse prestando atención a lo siguiente:

- *Controles de tejido*. Los controles externos deben de teñirse como se espera. No hay controles internos normales para HER2.
- *Correlación con la morfología y con otros resultados de biomarcadores*. Si la prueba HER2 por IHQ es negativa, pero el tumor tiene características asociadas con positividad de HER2, se debe considerar repetir la prueba por ISH.

ASCO y CAP han publicado recientemente recomendaciones actualizadas para informar los resultados de las pruebas de HER2 por IHC

Resultado	Criterios
Negativo (Score 0)	No se observa tinción o Tinción de membrana incompleta, débil/apenas perceptible en $\leq 10\%$ de las células tumorales
Negativo (Score 1+)	Tinción de membrana incompleta, débil/apenas perceptible en $> 10\%$ de las células tumorales*
Equívoco-dudoso (Score 2+)	Tinción de membrana incompleta y/o tinción ligera a moderada en $> 10\%$ de las células tumorales o Tinción completa intensa en $\leq 10\%$ de las células tumorales
Positivo (Score 3+)	Tinción completa intensa en $> 10\%$ de las células tumorales

Pruebas de HER2 mediante hibridación in situ

Para determinar la presencia o ausencia de amplificación del gen HER2 se puede emplear hibridación in situ con fluorescencia (FISH), cromogénica (CISH), o con la plata (SISH). Algunas pruebas utilizan una sola sonda para determinar el número de copias del gen HER2 presentes, pero la mayoría de las técnicas actual-

mente incluyen una sonda para el centrómero del cromosoma (CEP17) y otra sonda para el gen HER2 y así poder determinar la relación de las señales gen/centrómero.

Todo carcinoma de mama que muestre un resultado inicial de IHQ 2+ (equivoco-dudoso) debe ser analizado de nuevo usando ISH. Si las pruebas de ISH no demuestran amplificación del gen HER2, el resultado debe ser informado como negativo. Si la ISH demuestra la amplificación de las señales del gen HER2, el resultado debe ser considerado como positivo.

La ausencia de resultado con ISH puede ser debido a las siguientes situaciones:

- Fijación prolongada en formol (> 1 semana),
- Empleo de fijadores diferentes al formol,
- Procedimientos de fijación en los que intervenga un ácido (por ejemplo, la descalcificación) pueden degradar el ADN,
- Tratamiento insuficiente del tejido con proteasa.

Para los estudios de HER2 mediante ISH, el tejido debe estar bien fijado en formol tamponado neutro. Se debe seleccionar las áreas que están bien conservadas y sin de necrosis o artefacto quirúrgico. En las piezas quirúrgicas, lo ideal es fijar una loncha fina del tumor tan pronto como sea posible después de la cirugía. Se recomienda la fijación en un volumen adecuado de formol durante un mínimo de 6-8 horas (preferiblemente 24 horas). Los períodos de fijación más cortos dan lugar a daño o degradación del ADN y por tanto a una señal de ISH débil.

La técnica de ISH no debe llevarse a cabo de forma rutinaria en biopsias con aguja gruesa. La ISH puede realizarse sobre biopsias con aguja gruesa en circunstancias especiales (por ejemplo, cuando está prevista terapia neoadyuvante o cuando ningún otro tejido está disponible). Las áreas de CDIS no debe valorarse.

ASCO y CAP han emitido recientemente recomendaciones actualizadas para informar los resultados de las pruebas de HER2 por ISH.

Resultados de HER2 por hibridación in situ (ensayo de una sola sonda)

Resultado	Criterio
Negativo (no amplificado)	Promedio del número de copias de HER2 <4 señales por célula
Equívoco-dudoso	Promedio del número de copias de HER2 ≥ 4 y <6 señales por célula †
Positivo (amplificado)	Promedio del número de copias de HER2 ≥ 6.0 señales por célula †

† Observado en una población homogénea y contigua de $\geq 10\%$ de células tumorales

Resultados de las pruebas HER2 por hibridación in situ (ensayo de doble sonda)

Resultado	Criterio
Negativo (no amplificado)	Relación HER2/CEP17 <2 y número medio de copias HER2 <4 por célula
Equívoco-dudoso	Relación HER2/CEP17 <2 y número medio de copias HER2 ≥ 4 pero <6 por célula †
Positivo (amplificado)	Relación HER2/CEP17 ≥ 2 (independientemente del número medio de copias HER2)) o Promedio de número de copias HER2 ≥ 6 .por célula (independientemente de la relación)

Cuestiones importantes en la interpretación de ISH son las siguientes:

- *Identificación del carcinoma infiltrante:* el patólogo debe identificar en la hematoxilina y eosina (H&E) o HER2 IHC el área de carcinoma infiltrante para ser evaluado posteriormente mediante ISH.

- *Identificación de CDIS asociado*: en algunos casos, el CDIS mostrará amplificación del gen, mientras que el carcinoma invasivo asociado no lo hará. El análisis de ISH se debe realizar únicamente en el carcinoma invasivo.
- *Algunos tipos de carcinoma tienen un bajo nivel de expresión de HER2* tanto por IHC, como por los análisis de ISH. La repetición de la prueba puede ser útil para excluir posibles problemas técnicos con las técnicas, pero a menudo no dar lugar a resultados positivos o negativos definitivos.
- *Tanto el número de copias del gen HER2 o la relación de HER2 a CEP17 se pueden utilizar para determinar la presencia de amplificación*. En la mayoría de los carcinomas, ambos métodos darán el mismo resultado. En casos poco comunes, los 2 métodos dan resultados diferentes, por lo general debido a la variación en el número de señales CEP17. Algunos estudios han demostrado que anomalías en el cromosoma 17 pueden llevar a alteraciones de la relación HER2/CEP17, lo que podría dar lugar a resultados equívocos o incorrectos de la ISH. En tales casos, el número de copias del gen puede ser un reflejo más preciso del estado de HER2.
- *Si se detecta heterogeneidad para la amplificación de HER2*, debe ser informado de acuerdo con los criterios recomendados por el Colegio Americano de Patólogos. La heterogeneidad se define como > 5% pero <50% de células tumorales que muestran amplificación de HER2. El porcentaje de tumor infiltrante que muestra amplificación de HER2 debe ser informado, junto con el número de copias del gen HER2 en ambos componentes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ballinger TJ, Sanders ME, Abramson VG. Current HER2 testing recommendations and clinical relevance as a predictor of response to targeted therapy. Clin Breast Cancer. 2014 In Press.
2. Barton S, Zabaglo L, A'Hern R, et al. Assessment of the contribution of the IHC4+C score to decision making in clinical practice in early breast cancer. Br J Cancer. 2012; 106(11):1760-5.
3. Cornejo KM, Kandil D, Khan A, Cosar EF. Theranostic and molecular classification of breast cancer. Arch Pathol Lab Med. 2014;138(1):44-56.
4. Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, et al. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in breast cancer working group. J Natl Cancer Inst. 2011; 103(22):1656-1664.
5. Fitzgibbons PL, Murphy DA, Hammond EH, Allred DC, Valenstein PN. Recommendations for validating estrogen and progesterone receptor immunohistochemistry assays. Arch Pathol Lab Med. 2010; 134(6):930-935.
6. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. Arch Pathol Lab Med. 2010; 134(6):907-922.
7. Maisonneuve P, Disalvatore D, Rotmensz N, et al. Proposed new clinicopathological surrogate definitions of luminal A and luminal B (HER2-negative) intrinsic breast cancer subtypes. Breast Cancer Res. 2014; 16(3):R65.
8. Pathmanathan N, Balleine RL. Ki67 and proliferation in breast cancer. J Clin Pathol. 2013; 66(6):512-6.
9. Polley MY, Leung SC, McShane LM, et al; International Ki67 in Breast Cancer Working Group of the Breast International Group and North American Breast Cancer Group. An international Ki67 reproducibility study. J Natl Cancer Inst. 2013; 105(24):1897-906.

10. Rakha EA, Pinder SE, Bartlett JM, et al; On behalf of the National Coordinating Committee for Breast Pathology. Updated UK Recommendations for HER2 assessment in breast cancer. *J Clin Pathol*. 2014 in Press.
11. Rakha EA, Starczynski J, Lee AH, Ellis IO. The updated ASCO/CAP guideline recommendations for HER2 testing in the management of invasive breast cancer: a critical review of their implications for routine practice. *Histopathology*. 2014;64(5):609-15.
12. Untch M, Gerber B, Harbeck N, et al. 13th St. Gallen international breast cancer conference 2013: primary therapy of early breast cancer evidence, controversies, consensus -opinion of a German team of experts (Zurich 2013). *Breast Care (Basel)*. 2013;8(3):221-9.
13. Vuong D, Simpson PT, Green B, Cummings MC, Lakhani SR. Molecular classification of breast cancer. *Virchows Arch*. 2014; 465(1):1-14.
14. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology-College of American Pathologists (ASCO/CAP) Clinical Practice Guideline Update (2013). *Arch Pathol Lab Med*. 2014; 138(2):241-56.
15. Yamamoto S, Chishima T, Mastubara Y, et al. Variability in measuring the ki-67 labeling index in patients with breast cancer. *Clin Breast Cancer*. 2015; 15(1):e35-9.
16. Yamamoto-Ibusuki M, Yamamoto Y, Yamamoto S, et al. Comparison of prognostic values between combined immunohistochemical score of estrogen receptor, progesterone receptor, human epidermal growth factor receptor 2, Ki-67 and the corresponding gene expression score in breast cancer. *Mod Pathol*. 2013; 26(1):79-86.