

REIAL ACADÈMIA DE FARMÀCIA DE CATALUNYA



DISCURSO

leído en el acto de ingreso del
Il·tre. Dr. Francisco Tresserra Casas
como Académico Correspondiente
celebrado el día 9 de mayo de 2005

PRESENTACION

a cargo del Académico Numerario
Ilmo. Dr. Tomas Adzet Porredón

REIAL ACADÈMIA DE FARMÀCIA DE CATALUNYA



DISCURSO

leído en el acto de ingreso del
Il·tre. Dr. Francisco Tresserra Casas
como Académico Correspondiente
celebrado el día 9 de mayo de 2005

PRESENTACION

a cargo del Académico Numerario
Ilmo. Dr. Tomas Adzet Porredón

La Academia no se hace solidaria de las opiniones que se exponen en las publicaciones de las cuales es responsable el autor.

PRESENTACION DEL NUEVO ACADEMICO

ILMO. SR. DR. TOMAS ADZET PORREDON

EXCELENTISIMO SEÑOR PRESIDENTE
MUY ILUSTRES SENORAS Y SEÑORES ACADEMICOS
SEÑORAS Y SEÑORES

En las últimas décadas estamos asistiendo a una fusión de disciplinas relacionadas con temas afines con la finalidad de aunar recursos para conseguir objetivos comunes creándose con ello grandes áreas del conocimiento. Sabemos que el objetivo de las ciencias de la salud es mejorar la calidad de vida humana actuando en la prevención de la enfermedad, en el tratamiento de esta cuando aparece y en el caso de que no se pueda incidir sobre ella, paliando sus efectos.

En la actualidad, este proceso es llevado a cabo por numerosos profesionales adscritos a diferentes ámbitos de manera que cada uno con su superespecialización, aportan una parte para formar el todo en la mejora de la salud de la población.

Así Médicos, Farmacéuticos, Biólogos, Químicos, Físicos, Estadísticos, etc. Constituyen una unidad interrelacionada con un objetivo común. Un ejemplo de esta mentada globalización del mundo sanitario es el de la incorporación del Doctor Francesc Tresserra a esta Real Academia de Farmacia de Cataluña.

Tratar de comentar con detalle la prestigiosa trayectoria profesional del beneficiario en función de un tiempo limitado dejaría fuera aspectos relevantes de su currículum, así que tratare de hacerlo en un marco de síntesis obligadamente resumida.

Francesc Tresserra nació en el seno de una familia con extensa tradición sanitaria como lo demuestran nueve generaciones en algo más de dos siglos de médicos. Cursó los estudios de Medicina en la Universidad de Barcelona y descubrió fomentado por su padre el Dr. Joaquín Tresserra su inclinación por las Ciencias Básicas. Fue alumno interno de Histología y alumno interno y ayudante de prácticas de la asignatura de Anatomía Patológica. Después de superar el examen MIR, se formó como médico especialista en Anatomía Patológica durante un periodo de cuatro años en el Hospital Mutua de Terrassa.

En 1994 se incorpora como médico Adjunto al Servicio de Anatomía Patológica del Instituto Universitario Dexeus dirigido por el Dr. Grases. En este mismo año obtiene el grado de Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad de Barcelona con una tesis dirigida por el Dr. Barastegui del Departamento de Ciencias Morfológicas de la Universidad de Barcelona.

Ha realizado diversas estancias de formación entre ellas en el Instituto Nacional de la Salud en Bethesda, en el Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas en Washington, en la Universidad de Harvard en Boston y en la Universidad de Emory en Atlanta.

Aunque su primera publicación en prensa científica vio la luz unos años antes de licenciarse, su labor investigadora y docente la ha realizado en el Servicio de Anatomía Patológica del Instituto Universitario Dexeus bajo la dirección del Dr. Pedro Juan Grases, en temas relacionados con la patología mamaria y ginecológica en estrecha relación con el Departamento de Obstetricia, Ginecología y Medicina de la Reproducción dirigido por el Dr. Santiago Dexeus, y en la actualidad por el Dr. Pedro N. Barri, habiendo publicado sesenta y siete artículos en revistas extranjeras cincuenta y seis en revistas nacionales. Ha presentado ciento cuarenta y tres comunicaciones en congresos nacionales e internacionales y ha contribuido en cinco libros sobre patología. Ha recibido doce premios por sus aportaciones científicas, tres de ellos internacionales.

En la actualidad es miembro seis Sociedades Médicas entre las que se incluyen la Sociedad Española de Anatomía Patológica, y la International Society of Senology. Es el jefe de Servicio de Anatomía Patológica del Instituto Universitario Dexeus, Secretario de la Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria y miembro del Patronato de la Fundación de Senología.

Por otra parte es bien conocido el hecho de que nuestra trayectoria académica se hace posible solo cuando nuestro entorno familiar esta dispuesto a una gran colaboración, como es el caso de su esposa Elena, médico y farmacéutica, que junto a sus tres hijas Gloria, Claudia y Raquel han apoyado al Dr. Tresserra en todo momento.

Esta Real academia de Cataluña esta atenta siempre a incorporar destacados valores profesionales de la Farmacia y Ciencias afines como es en este caso que admite al Dr. Francesc Tresserra Casas del Instituto Universitario Dexeus en el grupo de nuestros Académicos Correspondientes a quien recibimos con satisfacción y afecto y lo acogemos como un digno representante de la ciencia médica, como un experto en el análisis de tejidos patológicos y como un luchador de primera línea en la defensa de la calidad del paciente.

Seguidamente en su discurso de entrada creo que nos va a mejorar nuestros conocimientos sobre un tema de gran actualidad como es el cáncer de mama y podrán

observar que con la cita bibliográfica de Discursos de Académicos de esta Corporación se pone de manifiesto su gran interdisciplinaridad con las ciencias farmacéuticas.

Muchas gracias.

GANGLIO CENTINELA EN EL CANCER DE MAMA

RADIOFARMACOS E INMUNOHISTOQUIMICA

Discurso de ingreso del
Dr. Francisco Tresserra Casas
como Académico Correspondiente de la
Reial Acadèmia de Farmàcia de Catalunya
celebrado el 9 de mayo de 2005

Barcelona 2005

AGRADECIMIENTOS

Excelentísimo Señor Presidente,
Muy Ilustres Señores Académicos,
Señoras y Señores,
Apreciados amigos y familiares.

Es un gran honor para mí entrar a formar parte de ésta Reial Acadèmia de Farmàcia de Catalunya, y no puedo empezar este discurso sino con palabras de agradecimiento a quienes han hecho posible este momento, tanto en el aspecto personal, como profesional y científico.

En primer lugar gracias a los Doctores Guinea, Marín y particularmente al Doctor Adzet que han avalado mi propuesta.

Gracias también a aquellas personas e instituciones que han contribuido a mi formación y al desarrollo de mi carrera profesional: La Universidad de Barcelona, el Hospital Mutua de Terrassa y el Institut Universitari Dexeus, donde con el Doctor Grases, los integrantes del Servicio de Anatomía Patológica y los componentes del Comité de Mastología he podido desarrollar, entre muchas otras cosas, el tema del que versará éste discurso.

Gracias a mis padres y familia pero sobre todo a mi esposa Elena e hijas Glória, Cláudia y Raquel que constituyen un constante apoyo y estímulo para el trabajo.

Gracias a todos por este día y compartirlo conmigo.

INTRODUCCION

El cáncer de mama constituye en la actualidad uno de los principales problemas socio-sanitarios por ser la neoplasia más frecuente y la principal causa de muerte de la mujer en el mundo desarrollado (1). Es por esto que la excelencia de todos los esfuerzos investigadores en este campo se centran en disponer de medios para el diagnóstico precoz de la enfermedad o en etapas más tempranas, en el hallazgo de métodos que permitan establecer un pronóstico más exacto y en el descubrimiento de armas terapéuticas más eficaces contra el tumor y menos perjudiciales para la paciente.

De esta forma, estudios como la mamografía permiten diagnosticar cánceres de la glándula mamaria en fase pre-invasiva. La ecografía, permite detectar neoplasias de pequeño tamaño así como precisar si la enfermedad se ha extendido más allá de la mama a ganglios linfáticos axilares y de otros territorios ganglionares. La resonancia magnética y la tomografía computerizada (TC) ayudan a detectar si existe más de un tumor y la extensión del mismo. La tomografía por emisión de positrones (PET), mediante el uso de la 18-fluordesoxiglucosa como radiotrazador, muestra gran sensibilidad para la detección de metástasis a distancia(2-5).

En el ámbito quirúrgico, se utilizan cada vez más, y siempre que estén indicadas, técnicas conservadoras que implican una menor mutilación del órgano y menos complicaciones postoperatorias lográndose pronósticos equivalentes a las agresivas y poco estéticas intervenciones que se efectuaban a principios del siglo pasado. Las terapias adyuvantes, la radioterapia y la quimioterapia, están empleando tecnología y drogas más selectivas y eficaces para destruir las células tumorales que hayan podido quedar tras la intervención o se encuentren extendidas por el resto del organismo.

El pronóstico del cáncer de mama radica principalmente en el tamaño del tumor y en la existencia o no de metástasis ganglionares, y por tanto las técnicas diagnósticas, terapéuticas y complementarias convergen sus objetivos para incidir en la determinación de estos factores (6, 7). Se trata de estadificar el tumor y determinar otras variables pronósticas.

Un ejemplo de procedimiento diagnóstico-terapéutico que requiere de una aportación técnica multidisciplinaria y de la colaboración de distintas materias relacionadas con las ciencias de la salud y la farmacología, es la técnica del ganglio

centinela que permite precisar el estatus ganglionar reduciéndose la morbilidad del acto quirúrgico y lograr una mayor precisión en la predicción del curso de la enfermedad.

Es por ello que quiero utilizar este tema en el discurso como nexo entre la farmacia, en sus variantes analítica y farmacológica, y la medicina, en sus aspectos morfológicos y terapéuticos.

La localización del ganglio centinela ha sido posible gracias a la disponibilidad de radiofármacos y al avance de las técnicas analíticas de diagnóstico morfológico inmunohistoquímico utilizando anticuerpos monoclonales. Es así como el estudio anatomopatológico es más eficaz y de mayor valor predictivo. Finalmente, en función de que exista o no afectación neoplásica de este ganglio, la farmacopea actual, mediante agentes quimioterápicos de última generación o la hormonoterapia, permite ofrecer a la paciente un tratamiento específico para su enfermedad atendiendo el estadio evolutivo de la neoplasia.

FUNDAMENTO ANATOMICO-FUNCIONAL DE LA TECNICA DEL GANGLIO CENTINELA

Las células neoplásicas, en el proceso de metastatizar o extenderse más allá del órgano en el que asientan, deben romper la membrana basal que delimita el epitelio en el que se ha originado el tumor. Una vez rota la membrana basal, las células tumorales infiltran el estroma que da soporte al epitelio y alcanzan la pared de un vaso sanguíneo o linfático, atravesándola y penetrando en su luz. A partir de aquí las células tumorales entran en el torrente sanguíneo o linfático y pueden diseminarse por todo el organismo y colonizar en otros lugares anatómicos.

En el caso del cáncer de mama la metástasis más frecuente ocurre en los ganglios linfáticos, particularmente los localizados en el territorio axilar del mismo lado, donde llega la linfa proveniente del drenaje del pezón, el tegumento y los conductos galactóforos. Existe otro sistema interno que se origina en la región profunda de la mama y, atravesando los músculos pectoral e intercostales, se dirige a la cadena mamaria interna uniéndose al drenaje linfático que proviene del hígado. Hay otras localizaciones menos frecuentes como son ganglios interpectores (ganglio de Rotter), ganglios intramamarios, ganglios supraclaviculares o ganglios de la axila contralateral (8-10).

La técnica del ganglio centinela consiste en detectar cual es el grupo ganglionar al que drena la linfa proveniente de la zona donde se localiza el tumor e identificar el primer ganglio y presumiblemente el único que recibe esta linfa, es decir el primero susceptible a ser colonizado por células metastásicas; éste ganglio se denomina "ganglio centinela". Si tras el estudio anatomopatológico se descubre que no hay evidencias de metástasis en este ganglio, la probabilidad de que el resto de los ganglios linfáticos del mismo territorio presenten metástasis es prácticamente nula (11-15). De esta forma puede ahorrarse a la paciente la linfadenectomía completa que incluye las partes blandas de la axila, reduciendo la morbilidad de la intervención quirúrgica y además, reduciendo el tiempo de intervención y el de hospitalización (16, 17).

Las principales complicaciones del vaciamiento axilar (18) son las lesiones del plexo braquial o de la arteria axilar durante el acto quirúrgico y excepcionalmente un impedimento sostenido del drenaje linfático del brazo (19). Este linfedema braquial cursa con un aumento del diámetro del brazo y puede provocar una disminución en la movilidad de la extremidad y eventualmente dolor, enrojecimiento y aumento de la temperatura como signos de una linfadenitis. Esto es consecuencia de la sección de los vasos linfáticos que proceden de la extremidad superior y se agrava por la fibrosis axilar post-quirúrgica.

DETECCION DEL GANGLIO CENTINELA

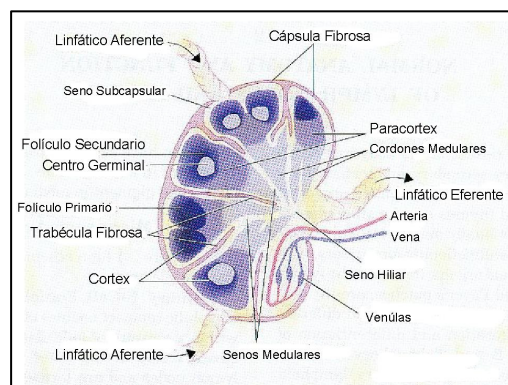
El sistema linfático está constituido por pequeños vasos que miden entre 10 y 15 micras de diámetro cuya pared delgada está revestida por una sola hilera de células endoteliales ancladas en una membrana basal discontinua. Los pequeños espacios de la membrana y aquellos entre célula y célula con superposición de sus bordes a modo de válvulas, que miden entre 10 y 25 nanómetros, permiten la entrada de pequeñas partículas hacia el torrente linfático. Hay además partículas de mayor tamaño que entran por pinocitosis, es decir atraviesan la célula endotelial por medio de pequeñas vesículas (20).

El vaso linfático experimenta movimientos peristálticos con una frecuencia de 10 a 15 contracciones por minuto gracias a la presencia de una doble capa de fibras

musculares que permiten el flujo de la linfa en sentido unidireccional gracias a la presencia de un sistema valvular que impide la circulación retrógrada (21).

El vaso linfático desemboca en el ganglio linfático a través del vaso aferente que atraviesa la cápsula y vierte su contenido en el seno marginal; luego la linfa circula por los senos medulares donde las partículas y células que transporta interactúan con el tejido linfóide del ganglio cumpliendo su función inmunológica. Posteriormente la linfa abandona el ganglio por el vaso linfático eferente (10) (Fig.1).

Figura 1: Anatomía del Ganglio linfático con el trayecto que sigue la linfa.



Los sistemas de detección del ganglio centinela se basan en colocar una partícula detectable en el tumor de la mama para que el sistema linfático la transporte hasta el primer ganglio que drena la linfa, siguiendo así el mismo trayecto de las células tumorales que darán lugar a las metástasis. Esta partícula deberá ser fagocitada por los macrófagos del ganglio permitiendo así su detección (22).

Para este fin las partículas utilizadas han de cumplir distintos requisitos:

- Tamaño de la partícula: Las partículas de pequeño tamaño no son fagocitadas por los macrófagos del ganglio y lo atraviesan dificultando su detección. Las de mayor tamaño entran por pinocitosis y por tanto con mayor lentitud, siendo fagocitadas por los macrófagos (23).
- Volumen de perfusión de la sustancia: Un volumen de perfusión pequeño no distorsiona la fisiología del drenaje linfático pero se cree que un mayor volumen de perfusión aumenta las posibilidades de detección del ganglio centinela a pesar de su mayor difusión en el lugar de la inyección (24).

Otros factores como son la edad de la paciente, el nivel de hidratación, los mediadores humorales y mecanismos neurales así como las drogas anestésicas utilizadas pueden alterar el transporte de la sustancia marcadora.

Por tanto los trazadores o sustancias identificadoras del ganglio centinela han de tener determinadas características fisicoquímicas y farmacocinéticas, concretamente han de carecer de polaridad, ser poco hidrosolubles, tener un volumen determinado e inyectarse en cantidad adecuada en el lugar apropiado.

Como sustancia trazadora se han utilizado clásicamente dos tipos, de forma independiente o combinada; los colorantes vitales y los trazadores isotópicos.

- Colorantes vitales: Fueron los primeros en utilizarse (25), pueden ser el azul de isosulfan, el azul vital o el azul de metileno, que inyectados en la zona del tumor en el momento del acto quirúrgico y tras un masaje en la zona de inyección para favorecer la difusión del colorante, permiten un seguimiento visual del drenaje linfático hasta llegar al primer ganglio. La eficacia de la utilización de colorantes vitales como único medio de detección del ganglio centinela se sitúa alrededor del 85% de tasa de detección (14). No obstante ello implica una disección quirúrgica más amplia del trayecto del flujo linfático, con lo que el procedimiento se convierte en algo más agresivo. Además pueden existir territorios en los que los colorantes utilizados no pueden llegar o llegan con dificultad dando lugar a falsos negativos como ocurre en el caso de la cadena mamaria interna, ganglios intramamarios o ganglios apicales directos.

- Trazadores isotópicos: Se habían utilizado en medicina nuclear para muchos fines pero no fue hasta 1993 en que Alex y Krag (26) los emplearon en el estudio del ganglio centinela. Se trata de coloides o micelas cuyas partículas son neutras y biológicamente inertes marcadas con un isótopo radiactivo, en este caso el tecnecio-99 que tiene un periodo de semidesintegración corto y tiene un riesgo de exposición a la radioactividad considerado escaso, tanto para la paciente como para el personal sanitario que lleva a cabo la técnica. Además es fácilmente detectable de forma externa por medio de una gammacámara o intraoperatoriamente utilizando una sonda gama.

Esta sustancia metálica constituye el núcleo del coloide, ya sea de forma solitaria o asociada a otro metal como el renio o el antimonio, de forma que a su alrededor se dispone una capa de moléculas de agua dando lugar a una estructura esferoidal en la que

las densidades de carga eléctrica están compensadas para dar lugar a una partícula neutra.

El tamaño resultante de la partícula coloide puede controlarse y ello repercute en el comportamiento que esta tienen en el organismo. De esta forma se clasifican en partículas de pequeño tamaño o nanocoloides, partículas de tamaño intermedio y partículas de gran tamaño (27).

Entre los nanocoloides o partículas de pequeño tamaño, que presentan un diámetro entre 2 y 20 nanómetros, se incluyen compuestos de seroalbúmina humana, dextrano o trisulfuro de antimonio mezclados con tecnecio-99. Entre las partículas de tamaño intermedio, que miden entre 5 y 80 nanómetros de diámetro, encontramos la albúmina nanocoloidal, el sulfuro coloidal de tecnecio filtrado, el sulfuro de renio y el sulfuro de tecnecio estabilizado con gelatina. Y entre las partículas de gran tamaño, es decir de más de 100 nanómetros, existen el sulfuro de tecnecio no filtrado y la albúmina microcoloidal de tecnecio (28, 29).

Los compuestos utilizados son *kits* reconocidos por la farmacopea española y sometidos a los controles de calidad requeridos, aunque en Estados Unidos, el único radiofármaco aprobado hasta la fecha para su utilización en la técnica del ganglio centinela por la Food and Drug Administration, es el sulfuro coloidal de tecnecio-99 (30).

El tamaño de la partícula influye de forma directa en la probabilidad de detección del ganglio centinela de tal forma que partículas de pequeño tamaño permiten una rápida difusión aunque ello implica una visualización de numerosos ganglios linfáticos de drenaje. En cambio, las de gran tamaño, disminuyen el número de ganglios detectados, por tanto se aproximan más a la finalidad de la técnica a expensas del riesgo de que no se produzca una migración efectiva del radiotrazador. Cada grupo debe estandarizar su técnica con el tipo de radiofármaco utilizado en función de su experiencia, disponibilidad y variables tecnológicas.

Estas limitaciones ponen de manifiesto que los radiocoloides disponibles hoy en día no fueron diseñados para la técnica del ganglio centinela; queda por tanto la posibilidad de que la investigación radiofarmacológica en el futuro proporcione una partícula que difunda de forma rápida y eficaz por el sistema linfático y llegue a un sólo ganglio centinela, provocando una mínima reacción tisular.

En los inicios de la técnica del ganglio centinela se utilizó la inyección de un colorante vital. Posteriormente se combinó con la utilización de un radiofármaco y en la actualidad la detección del ganglio centinela se efectúa únicamente con la inyección de un trazador radioactivo.

Con el progreso de la técnica también ha ido variando el punto de inyección del trazador para permitir una mejor localización del ganglio centinela (31). Estas son las posibles vías:

- Vía subdérmica: se inyecta el trazador por debajo de la piel en el área de la mama en la que asienta el tumor.
- Vía intratumoral: se inyecta el trazador directamente dentro del tumor.
- Vía intersticial peritumoral: el trazador se inyecta mediante múltiples punciones en la mama que rodea al tumor, procurando englobar todo su volumen.
- Subareolar: Se utiliza para colorantes vitales y se inyectan debajo de la areola.

En la práctica clínica, el trazador isotópico se inyecta en el intersticio peritumoral ya sea palpando directamente el tumor o a través de una guía ecográfica si la masa tumoral no es palpable. Posteriormente se efectúa una linfogammagrafía prequirúrgica para comprobar que el trazador ha alcanzado el territorio ganglionar, determinar a que región ha migrado y el número de ganglios localizados. En estos momentos el isótopo radiactivo ya ha comenzado a ser fagocitado por los macrófagos del ganglio y permanece en él por un periodo aproximado de 24 horas, tiempo límite en el que deberá practicarse la intervención quirúrgica para proceder a su extirpación.

En el acto quirúrgico se lleva a cabo primero el tratamiento sobre el tumor mamario que en función de su tamaño, factores pronósticos adversos o motivos estéticos, será conservador, es decir extirpando sólo el tumor y preservando el resto de la mama, o radical, con la exéresis completa de la glándula mamaria. Posteriormente, y con la ayuda de una sonda portátil, se efectuará un rastreo del territorio ganglionar que previamente ha señalado la linfogammagrafía.

La sonda gamma consiste en un pequeño cabezal, habitualmente hecho de un material semiconductor como el telurato de cadmio, que lleva adaptado un colimador a modo de diafragma y que aumenta la resolución y la direccionalidad de la sonda. La actividad radiactiva detectada por la sonda se transforma en impulsos eléctricos y es convertida en impulsos o cuentas por segundo de forma que la intensidad y la frecuencia

de los signos audibles son directamente proporcionales a la intensidad de la radiactividad detectada. La sonda, convenientemente cubierta por material estéril, permite un rastreo del territorio ganglionar y detectar la zona donde hay más radiación, por tanto, más cuentas por segundo, denominado "*hot spot*" o punto caliente que es donde se ubica el ganglio centinela. Una vez localizado se extirpa y se procede a su análisis histopatológico.

En nuestro centro empezamos a practicar la técnica del ganglio centinela en el año 1998, siguiendo un periodo de aprendizaje y validación de la técnica de 40 meses en los que ésta se efectuó en 112 pacientes. Los criterios de inclusión de las pacientes eran que el tumor fuese único y de tamaño inferior a 2.5 cm y sin evidencias de afectación axilar demostrada mediante ecografía. Se descartaron aquellas pacientes gestantes o con tratamientos quimioterápicos previos a la cirugía. Los resultados se compararon con los de un grupo control de 86 pacientes en las que se practicó una linfadenectomía completa sin aplicar la técnica del ganglio centinela. Posteriormente y hasta la fecha se ha aplicado esta técnica a 144 pacientes más. La tasa de detección del ganglio centinela en nuestra experiencia ha sido del 98,6%, por tanto sólo en 4 pacientes ni el colorante ni el radiotrazador consiguieron poner de manifiesto el ganglio centinela.

DIAGNOSTICO ANATOMOPATOLOGICO DEL GANGLIO CENTINELA

Una vez extraído el ganglio centinela se secciona por la mitad y se fija en formol al 10% durante un periodo aproximado de 12 horas. Después se deshidrata mediante inmersión sucesiva en alcohol y xilol, incluyéndose finalmente en parafina para poder efectuar las secciones histológicas correspondientes. A pesar de que el espécimen ha estado expuesto a la radiación, en principio no deben de tenerse cuidados especiales ya que el nivel de radiación se considera mínimo. Existen trabajos que demuestran que para sobrepasar los niveles de seguridad de radiación recomendados, un patólogo puede estar manipulando un espécimen de ganglio centinela durante más de 17.000 horas (32).

El espécimen que se obtiene tras la intervención es el ganglio que tiene más probabilidades de presentar una metástasis, por tanto esta debe de buscarse de forma exhaustiva.

Para ello se dispone principalmente de dos técnicas complementarias a la observación microscópica y que aumentan su rendimiento (Tabla 1), estas son los cortes seriados y las técnicas de inmunohistoquímica (12, 33, 34):

- Cortes seriados: En lugar de efectuar una sección del ganglio, teñida con hematoxilina eosina, para examinarla al microscopio como se hace rutinariamente, se practican múltiples secciones a distintos niveles para su estudio microscópico. Disponer de múltiples secciones seriadas del ganglio aumenta el área del órgano que se examina aumentando de forma proporcional las posibilidades de detectar células metastásicas (35).

- Inmunohistoquímica: Se basa en la afinidad de la reacción antígeno anticuerpo. El ganglio linfático está constituido predominantemente por células linfoides, histiocitarias, estromales y vasos. Las células metastásicas son epiteliales y por tanto de una estirpe histológica distinta a las que habitualmente se encuentran en el ganglio linfático. Al ser células histogenéticamente distintas, su expresión antigénica también es distinta y por tanto la utilización de anticuerpos monoclonales especialmente producidos para reaccionar con antígenos específicos de las células epiteliales y marcados con una molécula cromógena que sea visible mediante el microscopio óptico hace que puedan detectarse células epiteliales en el ganglio linfático (36, 37). El anticuerpo que se utiliza va dirigido a reaccionar contra las citoqueratinas, que actúan de antígeno, y son proteínas estructurales intracitoplasmáticas presentes en casi todas las células epiteliales. En la actualidad se conocen más de 20 subtipos de citoqueratinas con pesos moleculares distintos que oscilan entre los 40.000 y 68.000 Kd. Es por ello que para el diagnóstico anatomopatológico del ganglio centinela se utiliza un "*cocktail*" de anticuerpos dirigidos contra varias citoqueratinas, como es el AE1/AE3, para aumentar la sensibilidad de la técnica (38). Estos métodos permiten detectar la presencia en un ganglio linfático de cúmulos formados por muy pocas células tumorales que de otra forma no serían visibles con técnicas de microscopía óptica convencional.

Tabla 1: Detección de metástasis en ganglios axilares en pacientes con cáncer de mama en función de la técnica utilizada (modificado de Dowlats Shahi K, et al. 1997(24)).

AUTOR	TECNICA	COLORACION	DETECCION
Saphir 1948	Secciones seriadas	H&E	10/30 (33%)
Pickren 1961	Secciones seriadas. Intervalo 12 μ	H&E	21/97 (22%)
Fisher 1978	Secciones seriadas. Intervalo 5 μ	H&E	19/78 (24%)
Wilkinson 1982	Revisión láminas Secciones seriadas	H&E	89/525 (17%)
Wells 1984	Rutina	IH (3Ac)	7/45 (16%)
Bussolati 1986	Rutina	HE	5/50 (10%)
		IH (3Ac)	12/59 (20%)
Trojani 1987	Rutina	IH (5Ac)	21/150 (14%)
Bryne 1987	Re-tinción	IH (1Ac)	4/40 (10%)
Elson 1993	Secciones seriadas. Intervalo 5 μ	H&E	20/97 (21%)
		IH (2Ac)	
Nasser 1993	5 Secciones, una cada 150 μ	H&E	50/159 (31%)
		IH	
McGuckin 1996	4 Secciones, una cada una cada 100 μ	IH	53/208 (25%)

H&E: Hematoxilina-eosina. IH: Inmunohistoquímica. Ac: Anticuerpos

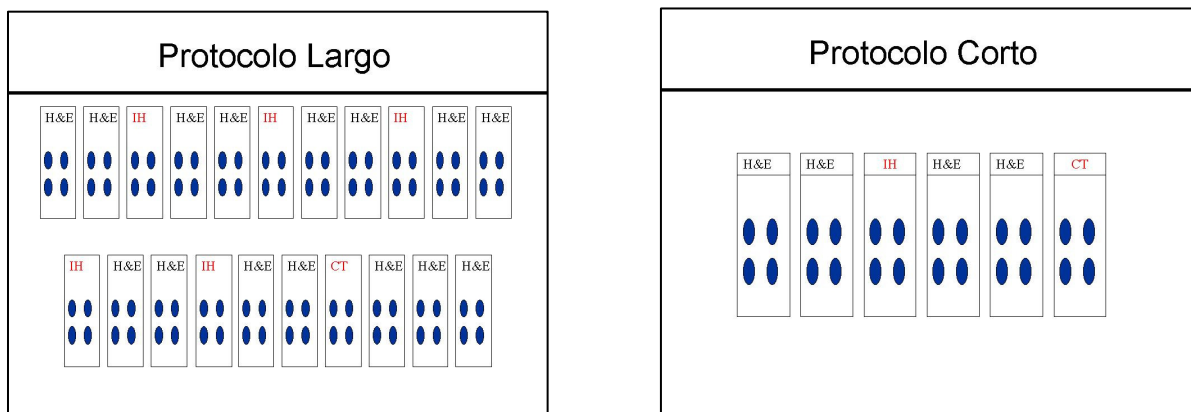
En nuestra experiencia hemos utilizado de forma prospectiva la combinación de la técnica de cortes seriados y la técnica inmunohistoquímica para detectar metástasis en ganglios centinela de pacientes afectas de cáncer de mama (39-41).

Desde que empezamos con la técnica del ganglio centinela esta ha sufrido evoluciones en función de la adquisición de experiencia en la misma. En los primeros 167 casos efectuamos un protocolo de múltiples secciones hasta obtener un total de 21 láminas histológicas, de las cuales seis láminas intercaladas se destinaban al estudio del ganglio mediante inmunohistoquímica y el resto se visualizaba mediante técnicas rutinarias de tinción como la hematoxilina-eosina (Figura 2). Con ello teníamos la sensibilidad que nos ofrecía el rango de múltiples secciones (oscilaba entre 42 y 168) y la especificidad de la inmunohistoquímica para detectar células epiteliales en el ganglio mediante la utilización de anticuerpos monoclonales especialmente dirigidos contra las citoqueratinas.

Una vez establecidos los patrones morfológicos de los distintos tipos de metástasis y de determinar nuestra tasa de detección óptima, pudimos reducir tanto el número de

secciones estudiadas mediante hematoxilina-eosina como el número de secciones estudiadas mediante inmunohistoquímica, concretamente a cinco y una respectivamente (Figura 2). Con ello disminuíamos el coste de la técnica, sobre todo en el tiempo empleado, obteniendo resultados de detección de metástasis en el ganglio centinela similares mediante ambas técnicas.

Figura 2: Esquema de los protocolos de estudio anatomopatológico del ganglio centinela



H&E: Láminas teñidas con Hematoxilina – Eosina. IH: Láminas teñidas con Inmunohistoquímica para la detección de citoqueratinas. CT: Lamina de control para el estudio Inmunihistoquímico.

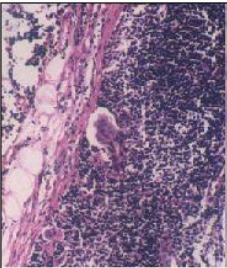
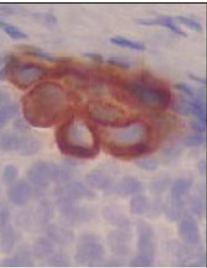
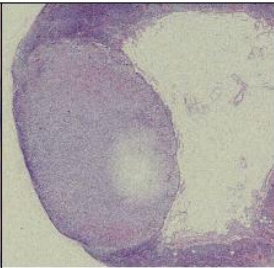

En los primeros 112 casos, además de identificar y extirpar el ganglio centinela y estudiarlo siguiendo los protocolos citados, se practicó la linfadenectomía completa adicional o extirpación de todos los ganglios axilares además del centinela. Ello fue necesario para poner a punto la técnica y coordinar al equipo multidisciplinario para su manejo. Así conseguimos una tasa de detección acorde con las descritas en la literatura, observándose el menor número posible de falsos negativos, es decir aquellos casos en los que en el ganglio centinela no se encuentran células neoplásicas y éstas aparecen en algún otro ganglio linfático del resto del contenido axilar sin que la técnica del ganglio centinela lo hubiese detectado.

Con esta técnica, el objetivo del patólogo es detectar células tumorales, por tanto malignas, en el ganglio linfático. Según sus características y tamaño, la afectación ganglionar puede ser del tipo (Figura 3):

- Metástasis: Son grupos de células tumorales malignas que colonizan el ganglio y que en conjunto miden más de 0,2 cm.

- Micrometástasis: Son grupos de células tumorales malignas que generalmente se disponen en la periferia del ganglio que miden entre 0,2 mm y 0,2 cm.
- Células tumorales aisladas: Son células epiteliales sueltas o en pequeños grupos que miden menos de 0,2 mm y que habitualmente se disponen en el seno subcapsular. Por su tamaño y localización, generalmente sólo se detectan mediante la utilización de técnicas inmunohistoquímicas.

Figura 3: Tipo de afectación ganglionar en función del tamaño del grupo de células tumorales

			
Celulas Tumorales Aisladas	Micrometástasis	Metástasis	
Grupo de células tumorales de no más de 0.2 mm	Grupo de células tumorales de entre 0.2 y 2 mm	Grupo de células tumorales mayor de 2 mm	

Una vez establecidos los hallazgos histopatológicos en el ganglio centinela se clasifican de acuerdo a sistemas internacionales estandarizados como es la clasificación TNM de los tumores malignos que ofrece la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC) (42). En ellas se tienen en cuenta el tamaño del tumor (T), la afectación ganglionar o nodal (N) y las metástasis a otros órganos (M). Esta clasificación considera la ausencia de células tumorales en el ganglio linfático como pN0 y la presencia de metástasis como pN1, subclasificándola en pN1mi si esta es una micrometástasis, es decir entre 0,2 mm y 0,2 cm. En el caso de existir células tumorales aisladas se considera al ganglio linfático como no metastásico, es decir pN0 pero se le añade una I+ entre paréntesis para indicar que se han detectado células tumorales aisladas (del inglés isolated tumor cells) utilizando técnicas que no son las de rutina como los cortes seriados o la inmunohistoquímica. Si además de estas técnicas se utilizan otras como la de la reacción en cadena de la

polimerasa u otros sistemas de detección a nivel molecular en lugar de I+ se especifica mediante mol+.

En estos siete últimos años hemos tenido la oportunidad de estudiar los ganglios centinelas de 252 pacientes intervenidas por cáncer infiltrante de la glándula mamaria. En estas se detectaron 365 ganglios centinelas, ello es debido a que en ocasiones el trazador utilizado para la detección marcó de forma simultánea a dos o más ganglios. De estos 365 ganglios, 256 (70%) fueron negativos, es decir en ellos no se detectaron células tumorales ni tras efectuar cortes seriados ni con la utilización de técnicas inmunohistoquímicas. En 37 ganglios (10%) se detectaron células tumorales aisladas, es decir grupos de células neoplásicas cuyo diámetro agregado no superaba los 0,2 mm. En 31 de estos 37 ganglios el diagnóstico se efectuó sólo mediante la utilización de técnicas inmunohistoquímicas para la detección de citoqueratinas. En otros 37 (10%) ganglios se detectaron micrometástasis o cúmulos de células tumorales cuyo diámetro agregado medía entre 0,2 mm y 0,2 cm. Únicamente en una de ellas se requirió de las técnicas inmunohistoquímicas para su diagnóstico. Finalmente, 35 ganglios (10%) mostraron metástasis o agrupaciones de células tumorales superiores a 0,2 cm y en ninguno de ellos fueron necesarias las técnicas de inmunohistoquímica para su diagnóstico.

El empleo de técnicas de estudio más precisas, como los cortes seriados y la inmunohistoquímica en el estudio de un número reducido de ganglios, hace que aumente la posibilidad de detección de células tumorales en dicho ganglio. Con los resultados obtenidos se pone de manifiesto que cuanto menor es el tamaño de los grupos de células tumorales mayor es el número y la sofisticación de las técnicas que deben emplearse para su detección. Por ejemplo, si no hubiésemos utilizado técnicas de inmunohistoquímica, 37 de los 365 ganglios estudiados no se hubiesen diagnosticado correctamente, 36 de ellos con células tumorales aisladas y uno con micrometástasis.

Con esta técnica, en 164 de las 256 pacientes no se detectó la presencia de células tumorales en el ganglio linfático y en 88 sí, y en 16 de estas había más de un ganglio centinela afectado.

También hay que señalar que además de hacia el territorio axilar en 29 pacientes el trazador detectó drenaje hacia la cadena mamaria interna y en cuatro de ellas este grupo estaba afectado.

En 140 pacientes se efectuó linfadenectomía completa además de la extirpación del ganglio centinela, bien porque se trataron en el periodo de aprendizaje de la técnica o bien por que mostraron afectación metastásica del ganglio centinela. En 126 de ellas no se demostró afectación tumoral en ninguno de los otros ganglios extirpados. En las 14 restantes había afectación de más ganglios de la axila además del centinela y en 6 pacientes cambió la estadificación de la enfermedad hacia un estadio superior. Esto pone de manifiesto la necesidad de completar una linfadenectomía en aquellas pacientes en las que se detecte una metástasis en el ganglio centinela como única forma de lograr una correcta estadificación de la enfermedad y poder aplicar el tratamiento mas adecuado.

Por tanto el hecho de disponer de un ganglio en el que se ha demostrado que el drenaje linfático proveniente del tumor es el primero en llegar, nos obliga a efectuar un estudio exhaustivo en busca de células tumorales, lo cual es posible gracias a las técnicas de cortes seriados e inmunohistoquímicas, detectándose de esta forma una mayor incidencia de afectación ganglionar que cuando no se aplican estas técnicas. En nuestra experiencia la tasa de detección de micrometástasis antes de utilizar la técnica del ganglio centinela era del 8,5% de las pacientes con ganglios positivos. Desde que se estudia el ganglio centinela el porcentaje de detección de ganglios con cúmulos de células tumorales de 0,2 cm o menores asciende al 66% (58 de 88). Por tanto concluimos que es una técnica eficaz y que resulta en el beneficio de la paciente al estar el tumor estadificado de forma más precisa, pudiéndose establecer un pronóstico con mayor exactitud y aplicar un tratamiento complementario más eficaz en caso de considerarse indicado.

Por otra parte, en aquellas pacientes con ganglios centinela negativos demostrados inmunohistoquímicamente, la posibilidad de que existan metástasis en otros ganglios linfáticos es prácticamente nula con lo que la linfadenectomía completa se hace innecesaria y ahorramos las complicaciones que esta conlleva.

IMPLICACIONES TERAPEUTICAS DEL ESTATUS DEL GANGLIO CENTINELA

Una vez se ha estudiado minuciosamente el ganglio centinela, se dispone de uno de los principales datos para establecer la conducta a seguir para tratar a la paciente (43). Si el ganglio centinela ha sido negativo, es decir, no se han logrado identificar células tumorales en él, no será necesario efectuar la linfadenectomía axilar y se tendrán en

cuenta otros factores dependientes del tumor o de la paciente para establecer el tratamiento adyuvante. Estos factores son el tamaño tumoral, el grado de diferenciación histológico de la neoplasia y la edad de la paciente (44). Si estos factores son favorables (tamaño tumoral igual o menor de 1 cm, grado histológico 1 y estatus menopáusico), la paciente seguirá controles clínicos y radiológicos periódicos sin necesidad de tratamiento adyuvante. Si son desfavorables (tamaño tumoral superior a 1 cm, grado histológico 2 ó 3 o edad inferior a 50 años), el tratamiento deberá completarse con quimioterapia. Si el ganglio centinela ha sido positivo, la conducta a seguir vendrá establecida en función del tipo de afectación; si es una metástasis o micrometástasis, se procederá a efectuar una linfadenectomía axilar completa y se administrará quimioterapia complementaria. Si se han detectado células tumorales aisladas, se tratará a la paciente igual que si el ganglio centinela hubiese sido negativo y no será necesario por tanto efectuar el vaciamiento axilar completo, administrándose quimioterapia o no, en función de factores dependientes del tumor o de la paciente.

Actualmente estamos participando en estudios multicentricos, prospectivos y randomizados de pacientes con micrometástasis en el ganglio centinela, de forma que en algunas de ellas se practica el vaciamiento axilar completo y se actúa en función del resultado y en otras no. Estos estudios requieren todavía de un tiempo más prolongado de seguimiento para disponer de resultados definitivos.

En cualquiera de los casos, independientemente del resultado del ganglio centinela, se añadirá radioterapia si se ha efectuado un tratamiento conservador, es decir, si sólo se ha extirpado el tumor dejando el resto de la mama, y se administrará tratamiento hormonal mediante tamoxifeno durante 5 años si las células neoplásicas expresan receptores hormonales de estrógenos y/o progesterona determinados generalmente por métodos inmunohistoquímicos, para efectuar después una hormonoterapia de continuación con fármacos inhibidores de la aromatasa.

Los regímenes de quimioterapia que se aplican son; el CMF que incluye ciclofosfamida, metotrexato y fluorouracilo; el FAC que consta de fluorouracilo, adriamicina y ciclofosfamida, y los esquemas que incluyen el taxol, ya sea el paclitaxel o el docetaxel.

Para finalizar y a modo de resumen, me gustaría resaltar la importancia de esta técnica en la que gracias al aporte de métodos como la utilización de radiofármacos y

anticuerpos monoclonales, y la participación de un equipo sanitario multidisciplinar que incluye ginecólogos, cirujanos, radiólogos, médicos nucleares, patólogos, farmacólogos y oncólogos, es posible diagnosticar de forma más precisa la extensión tumoral del cáncer de la mama a los ganglios linfáticos, evitando efectuar vaciamientos axilares completos ahorrando la morbilidad que ello conlleva. El diagnóstico más eficaz permite también establecer un tratamiento más concreto y ajustado a la paciente y al tipo de tumor, con la intención de lograr mejores tasas de curación y supervivencia.

Esto es todo y muchas gracias por su atención.

BIBLIOGRAFIA

- 1- Wingo PA, Cardinez CJ, Landis SH, Greenlee RT, Ries LA, Anderson RN, Thun MJ. Long-term trends in cancer mortality in the United states, 1930-1998. *Cancer* 2003; 97 (Suppl. 12): 3133-3275.
- 2- Eubank WB, Mankoff DA. Current and future uses of positron emission tomography in breast cancer imaging. *Semin Nucl Med* 2004; 34: 224-240.
- 3- Tresserra F, Feu J, Grases PJ, Navarro B. Ultrasonographic detection of normal lymph nodes in patients with breast cancer. *Br J Radiol* 1999; 72: 827-828.
- 4- Feu J, Tresserra F, Grases PJ, Navarro B. Ultrasonographic findings for in vitro detection of metastatic breast cancer in axillary lymph nodes. *J Ultrasound Med* 1999; 18: 727-728.
- 5- Feu J, Tresserra F, Fábregas R, Navarro B, Grases PJ, Suris JC, Fernández-Cid A, Alegret X. Metastatic breast carcinoma in axillary lymph nodes: In vitro US detection. *Radiology* 1997; 205: 831-835.
- 6- Tresserra F, Feu J, Grases PJ, Navarro B, Alegret X, Fernandez-Cid A Assessment of breast cancer size: sonographic and pathologic correlation. *J Clin Ultrasound* 1999; 27: 485-491.
- 7- Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, Ruby SG, O'Malley F, Simpson JF, Connolly JL, Hayes DF, Edge SB, Lichter A, Schnitt SJ. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med.* 2000; 124: 966-978.
- 8- Tanis PJ, Nieweg OE, Valdes Olmos RA, Kroon BBR. Anatomy and physiology of lymphatic drainage of the breast from the perspective of sentinel node biopsy. *J Am Coll Surg* 2001; 192: 399-409.
- 9- Testut L, Latarget A. *Tratado de Anatomía humana*. Barcelona: Salvat Editores, S.A., 1954: 1361-1394.
- 10-Van der Valk P, Meijer CJLM. Reactive lymph nodes. En Sternberg SS (ed.) *Histology for pathologist*. New York: Raven press 1992: 233-252.
- 11-Hsueh EC, Hansen N, Giuliano AE. Intraoperative lymphatic mapping and sentinel lymph node dissection in breast cancer. *CA Cancer J Clin* 2000; 50: 279-291.

- 12-Dowlatshahi K, Fan M, Snider HC, Habib FA. Lymph node micrometastases from breast carcinoma. Reviewing the dilemma. *Cancer* 1997; 80: 1188-1197.
- 13-Galimberti V, Zurrada S, Zucali P, Luini A. Can sentinel node biopsy avoid axillary dissection in clinically node-negative breast cancer patients? *The Breast* 1998; 7: 8-10.
- 14-Giuliano AE, Kirgan DM, Guenther JM, Morton DL. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. *Ann Surg* 1994; 220: 391-401.
- 15-Cserni G, Amendoeira I, Apostolikas N, Belloq JP, Bianchi S, Bussolati G, Boecker W, Borisch B, Connolly CE, Decker T, Dervan P, Drijkoningen M, Ellis IO, Elston CW, Eusebi V, Faverly D, Heikkila P, Holland R, Kerner H, Kulka J, Jacquemier J, Lacerda M, Martinez-Penuela J, De Miguel C, Peterse JL, Rank F, Regitnig P, Reiner A, Sapino A, Sigal-Zafrani B, Tanous AM, Thorstenson S, Zozaya E, Wells CA; European Working Group for Breast Screening Pathology. 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: 1654-1667.
- 16-Posther KE, Wilke LG, Giuliano AE. Sentinel lymph node dissection and the current status of American trials on breast lymphatic mapping. *Semin Oncol* 2004; 31: 426-436.
- 17-Chu KU, Turner RR, Hansen NM, Brennan MB, Bilchik A, Giuliano AE. Do all patients with sentinel node metastasis from breast carcinoma need complete axillary node dissection?. *Ann Surg* 1999; 229: 536-541.
- 18-Fabregas R. Tratamiento quirúrgico del cáncer de mama invasor inicial. En Fernandez Cid A (Ed.). *Mastología*. Barcelona: Masson, 2000: 569-579.
- 19-Armer J, Fu MR, Wainstok JM, Zagar E, Jacobs LK. Lymphedema following breast cancer treatment, including sentinel lymph node biopsy. *Lymphology* 2004; 37: 73-91.
- 20-Schmid-Schonbein GW. Microlymphatics and lymph flow. *Physiol Rev* 1990; 70: 987-1028.
- 21-Olszewski WL, Engeset A. Lymphatic contractions. *N Eng J Med* 1979; 300: 316.
- 22-Pozansky MJ. Enzyme-protein conjugates: new possibilities for enzyme therapy. *Pharmacol Ther* 1983; 21: 53-76.
- 23-Wilhelm AJ, Mijnhout GS, Franssen EJ. Radiopharmaceuticals in sentinel lymph node detection. An overview. *Eur J Nucl Med* 1999; 26 (Suppl. 4): S36-S42.

- 24-Ellner SJ, Hoh CK, Vera DR, Darrah DD, Sculteis G, Wallace AM. Dose-dependant biodistribution of [(99m)Tc] DTPA-mannosyl L-dextran for breast cancer sentinel lymph node mapping. *Nucl Med Biol* 2003; 30: 805-810.
- 25-Morton DL, Wen DR, Wong JH, Economou JS, Cagle LA, Storm FK, Foshag AJ, Cochran AJ. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg* 1992; 127: 392-399.
- 26-Alex JC, Krag DN. Gamma probe guided localization of lymph nodes. *Surg Oncol* 1993; 2: 137-143.
- 27-Valls O. Transport i vectorització de fàrmacs en sistemes col·loïdals polimèrics biodegradables. Discurs de recepció d'Academic corresponent a la Reial Acadèmia de Farmàcia de Catalunya. Barcelona, 18 d'abril de 1996.
- 28-Fraile M. Biopsia del ganglio centinela en pacientes con cáncer de mama en estados iniciales. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona 2001.
- 29-Mariani G, Erba P, Villa G, Gipponi M, Manca G, Boni G, Buffoni F, Castagnola F, Pagabelli G, Strauss HW. Lymphoscintigraphic and intraoperative detection of sentinel lymph node in breast cancer patients. The nuclear medicine perspective. *J Surg Oncol* 2004; 85: 112-122.
- 30-Winchester DJ, Sener SF, Winchester DP, Perlman RM, Golsdschmidt RA, Morykie G, Martz CH, Rabbitt SL, Brenin D, Stull MA, Moulthrop JM. Sentinel lymphadenectomy for breast cancer: experience with 180 consecutive patients: efficacy of filtered technetium 99m sulphur colloid with overnight migration time. *J Am Coll Surg* 1999; 188: 597-603.
- 31-Tuttle TM. Technical advances in sentinel lymph node biopsy for breast cancer. *Am Surg* 2004; 70: 407-413.
- 32-Stratmann SL, McCarty TM, Kuhn JA. Radiation safety with breast sentinel node biopsy. *Am J Surg* 1999; 178: 454-457.
- 33-Liu LH, Siziopikou KP, Gabram S, McClatchey KD. Evaluation of axillary sentinel lymph node biopsy by immunohistochemistry and multilevel sectioning in patients with breast carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124: 1670-1673.
- 34-Grases PJ. Miscelanea. En Grases PJ (Ed.) *Patología Ginecológica. Bases para el diagnóstico morfológico*. Barcelona: Masson, 2003: 480-484.

- 35-Meyer SJ. Sentinel node biopsy: strategies for pathologic examination of the specimen. *J Surg Oncol* 1998; 69: 212-218.
- 36-Zaragozá F. Los anticuerpos monoclonales en la farmacología actual. Discurso de recepción de Académico correspondiente de la Academia Iberoamericana de Farmacia. Granada, 17 de octubre de 2002.
- 37-Falini B, Taylor CR. New developments in immunoperoxidase techniques and their application. *Arch Pathol Lab Med* 1983; 107: 105-117.
- 38-DeLellis RA, Kwan P. Technical considerations in the immunohistochemical demonstration of intermediate filaments. *Am J Surg Pathol* 1988; 12 (Suppl. 1): 17-23.
- 39-Tresserra F, Grases PJ, Izquierdo M, Fábregas R, Fernández-Cid A. Detección de micrometástasis en el ganglio centinela de pacientes con cáncer infiltrante de mama. *Prog Obstet Ginecol* 2002; 45: 37-44.
- 40-Tresserra F, Lopez-Marín L, Serrano M, Catalán C, Dominguez MA, Fabra G, Grases PJ, Feu J, Fábregas R. Impronta citológica en el estudio de células tumorales aisladas y micrometástasis en el ganglio centinela de pacientes con cáncer de mama. XXII Reunión de la Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria. Valladolid 2003.
- 41-Tresserra F, Grases PJ, Fábregas R, Ara, C, Izquierdo M. Evaluación de un protocolo corto de estudio anatomopatológico del ganglio centinela. XXIII Congreso de la Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria. Zaragoza 2004.
- 42-Sobin LH, Wittekind Ch. UICC TNM classification of malignant tumours. New York: Wiley-Liss, 2002: 131-141.
- 43-Fernandez-Cid A. Mastología. Protocolos de diagnóstico, terapéutica y seguimiento. Comité de Mastología del Instituto Universitario Dexeus.
- 44-Goldrisc A, Wood WC, Gelbet RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn HJ. Meeting highlights: updated international experts consensus on the primary therapy of early breast cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21: 3357-336.