

B10. T 5751

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
FACULTAD DE MEDICINA



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
REGISTRE GENERAL
ENTRADA

29 JUN. 2001

N.º 86822
HORA 11.48
OFICINA AUXILIAR NÚM. 9

**EFICACIA DE LA QUIMIOTERAPIA SOBRE LA ELIMINACION
DE CELULAS TUMORALES OCULTAS EN MEDULA OSEA
EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA.
RELACION DE LAS CELULAS TUMORALES EN MEDULA
ÓSEA CON FORMAS EVOLUTIVAS DE LA ENFERMEDAD**



10001365310
Biblioteca Depòsit

TESIS DOCTORAL
Presentada por: M^a Teresa García García
Dirigida por : Dr Javier García-Conde Bru
Dra. Ana Lluç Hernández
Valencia, junio de 2001

UMI Number: U602993

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U602993

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

FACULTAT DE MEDICINA I ODONTOLOGIA DE VALÈNCIA

En el día de hoy se ha procedido a la lectura de la tesis titulada:

Eficacia de la quimioterapia sobre
la eliminación de citoma tumoral ocular
en un ojo en paciente con carcinoma
de D. Teresa García García
que ha obtenido la calificación de sobresaliente cum laude

Firmado El Presidente del Tribunal, Dr. D. Vicente Abello Candela
El Secretario, Dr. D. Carlos Solano Verat
El Vocal Dr. D. José M^{te} Morales Jimenez
El Vocal Dr. D. Miguel Martín Jimenez
El Vocal Dr. D. Felipe Prope Caobro

Valencia 2 de octubre de 2001

El Secretario del Tribunal

El Presidente

El Vocal

El Vocal

El Vocal

Firma del Alumno

Teresa García

DEPARTAMENTO DE MEDICINA PREVENTIVA, SALUD PÚBLICA, HIGIENE,
BROMATOLOGÍA, TOXICOLOGÍA Y MEDICINA LEGAL
SERVICIO DE ONCOLOGÍA MÉDICA Y HEMATOLOGÍA
HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO
UNIVERSIDAD DE VALENCIA



**EFICACIA DE LA QUIMIOTERAPIA SOBRE LA ELIMINACION
DE CELULAS TUMORALES OCULTAS EN MEDULA OSEA
EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA.
RELACION DE LAS CELULAS TUMORALES EN MEDULA
ÓSEA CON FORMAS EVOLUTIVAS DE LA ENFERMEDAD**

**M^a Teresa García García
Junio de 2001**



VNIVERSITAT D VALÈNCIA

Dº JAVIER GARCIA-CONDE BRU, Catedrático del Departamento de Medicina y Jefe del Servicio de Hematología y Oncología Médica del Hospital Clínico Universitario de Valencia

CERTIFICA

Que la Doctorando Mª Teresa García García ha realizado personalmente y bajo mi dirección el trabajo, para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía titulado

EFICACIA DE LA QUIMIOTERAPIA SOBRE LA ELIMINACION DE CELULAS TUMORALES OCULTAS EN MEDULA OSEA EN PACIENTES CON CANCER DE MAMA. RELACION DE LAS CELULAS TUMORALES EN MEDULA OSEA CON FORMAS EVOLUTIVAS DE LA ENFERMEDAD.

Y para que así conste, a efectos académicos, se expide el presente certificado .

Valencia a dieciocho de junio de 2001

Fdo. Dr. Dº Javier García-Conde Bru



Q. 1365293
L. 1365310





VNIVERSITAT Đ VALÈNCIA

D^a ANA LLUCH HERNANDEZ, Profesor Titular del Departamento de Medicina y Jefe de Sección del Servicio de Hematología y Oncología Médica del Hospital Clínico Universitario de Valencia

CERTIFICA

Que la Doctorando M^a Teresa García García ha realizado personalmente y bajo mi dirección el trabajo, para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía titulado

EFICACIA DE LA QUIMIOTERAPIA SOBRE LA ELIMINACION DE CELULAS TUMORALES OCULTAS EN MEDULA OSEA EN PACIENTES CON CANCER DE MAMA. RELACION DE LAS CELULAS TUMORALES EN MEDULA OSEA CON FORMAS EVOLUTIVAS DE LA ENFERMEDAD.

Y para que así conste, a efectos académicos, se expide el presente certificado .

Valencia a dieciocho de junio de 2001

Fdo. Dr. D^a Ana Lluich Hernández

A mis padres y hermanos, a mi familia y a tantas personas que son como mi familia, por haberme inculcado una visión abierta y optimista del valor de la vida y del trabajo: sin su ejemplo y apoyo no habría podido acometer muchas etapas de mi vida, una de las cuales concluye –o comienza- ahora.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. D. Javier García-Conde Bru, Jefe del Servicio de Oncología Médica y Hematología del Hospital Clínico Universitario de Valencia, Director de esta Tesis, por abrirme horizontes en el campo de la investigación y estimular constantemente una visión profesional, rigurosa y moderna de la especialidad de Oncología Médica.

A la Dra. D^a Ana Lluch Hernández, Jefe de Sección del Servicio de Oncología Médica y Hematología del Hospital Clínico Universitario de Valencia, codirectora de esta Tesis, infatigable fuente de ideas, por su ayuda en el planteamiento, discusión y presentación de esta tesis, y porque sabe unir humanidad y rigor científico en el trabajo

A la Dra. D^a Carmen Sáiz Sánchez, del Departamento de Medicina Preventiva, Salud Pública, Higiene, Bromatología, Toxicología y Medicina Legal, Tutora y amiga, por su paciencia y ánimo continuo a lo largo de tantos años.

A la Dra. D^a Isana Benet, médico Adjunto del Laboratorio de Hematología del Hospital Clínico Universitario, colaboradora constante y desinteresada en todo este proyecto, especialmente en el trabajo de laboratorio, discreta, eficaz y siempre disponible.

A la Dra. D^a Pilar Azagra, médico Adjunto del Servicio de Oncología Médica y Hematología del Hospital Clínico Universitario de Valencia, cuya dedicación profesional y honradez personal han dejado huella en varias promociones de Residentes del Servicio, por su apoyo constante y su ayuda en la revisión de muestras y presentación del trabajo.

A todos los miembros del Servicio de Oncología Médica y Hematología del Hospital Clínico Universitario de Valencia, cuya ilusión científica y profesional ha sido ejemplo a lo largo de todo el período de formación en la especialidad. A los Dres. Juanvi Ferrer y Vicente Escrig, por su colaboración en las extracciones de médula ósea y por el toque de humor y humanidad en el trabajo cotidiano.

A mis compañeros del período de Residencia, de quienes guardo un recuerdo más que entrañable, por su generosidad y porque hicieron fáciles los

momentos duros, especialmente los Dres. Eduardo Martínez de Dueñas y Antonio Gutiérrez García. A la Dra Belén Rubio, que ha apoyado este trabajo con interés y dedicación.

Al personal de enfermería, auxiliar y administrativo del Servicio de Oncología Médica y Hematología del Hospital Clínico de Valencia , tanto de la Sala como del Hospital de Día, Laboratorio y Consultas, siempre pacientes con los “recién iniciados” ; especialmente a D^a Concha Ivars, que ha trabajado esforzadamente en el procesamiento y evaluación de las muestras.

A los miembros de la Unidad de Cirugía Mamaria y del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico de Valencia, cuyo trabajo en el diagnóstico y tratamiento de las pacientes ha sido básico para realizar esta Tesis.

A D. Francisco Martínez Ruiz por su colaboración paciente en la gestión y análisis estadístico de los datos.

A mis compañeros del Servicio de Hematología y Oncología Médica del Hospital Morales Meseguer-General Universitario de Murcia, de quienes admiro su calidad humana y profesional, por su aliento y generosidad durante todo este último año, sin los cuales hubiera sido imposible concluir este proyecto. A los Residentes, que estimulan la formación continua y el impulso investigador de todos los miembros del Servicio.

Finalmente, a todas las pacientes que han participado en este estudio, por su confianza y valentía, con el deseo de que nuestro esfuerzo contribuya a su beneficio.

INDICE

| | |
|---|-----------|
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| I.1 Datos epidemiológicos | 1 |
| I.2. Historia natural del cáncer de mama | 1 |
| I.3. Bases teóricas para el tratamiento del cáncer de mama | 8 |
| I.4. Factores que influyen en el pronóstico del cáncer de mama | 9 |
| I.4.1. Factores pronósticos clásicos | 10 |
| I.4.2. Nuevos factores pronóstico | 13 |
| I.5. El concepto de enfermedad micrometastásica o enfermedad mínima residual | 14 |
| I.6. Procedimientos de detección de células tumorales ocultas en tumores de estirpe epitelial | 17 |
| I.6.1. Inmunocitoquímica | 17 |
| I.6.2. Citometría de flujo | 18 |
| I.6.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) | 18 |
| I.6.4. Cultivos celulares | 19 |
| I.7. Detección de células tumorales ocultas mediante inmunocitoquímica | 19 |
| I.7.1. Procedimiento y controversias en torno al mismo | 19 |
| I.7.2. Lugar de determinación | 22 |
| a) Células tumorales ocultas en médula ósea | 23 |
| b) Micrometástasis ocultas en ganglios linfáticos | 24 |
| c) Células tumorales circulantes en sangre periférica | 25 |
| I.8. Detección de células tumorales ocultas por inmunocitoquímica en médula ósea de pacientes con cáncer de mama | 26 |
| 1.8.1. Cáncer de mama localizado | 26 |
| 1.8.2. Pacientes con cáncer de mama metastásico | 28 |

| | |
|--|-----------|
| 1.9. Implicaciones clínicas de la detección de células tumorales ocultas en médula ósea de pacientes con cáncer de mama | 29 |
| I.9.1. Asociación con factores pronósticos | 29 |
| a) Clásicos | 29 |
| b) Nuevos factores pronósticos | 30 |
| I.9.2. Valor pronóstico | 31 |
| I.9.3. Implicaciones terapéuticas | 37 |
| - a) Aplicación en el autotrasplante de sangre periférica | 37 |
| - b) Utilidad en el tratamiento adyuvante | 38 |
| - c) Selección de nuevas modalidades terapéuticas | 40 |
| - d) Identificación de pacientes con riesgo elevado de metástasis óseas | 41 |
| - e) Tratamiento de la enfermedad metastásica | 42 |
| - f) Enfermedad mínima residual en pacientes con marcadores tumorales elevados | 42 |
| | |
| <u>II. HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS</u> | 46 |
| | |
| II.1. HIPOTESIS DE TRABAJO | 47 |
| II.2. OBJETIVOS | 48 |
| | |
| <u>III. PACIENTES Y METODO</u> | 50 |
| | |
| III.1. PACIENTES | 50 |
| | |
| III.1.1. Estudio del objetivo principal | 50 |
| Pacientes de tratamiento adyuvante (grupo 1) | 50 |
| Pacientes con enfermedad metastásica (grupo 2) | 52 |
| | |
| III. 1. 2. Estudio de los objetivos secundarios | 53 |
| El estudio de enfermedad mínima residual en pacientes con marcadores elevados | 53 |
| Determinación de células tumorales en sangre periférica | 55 |

| | |
|--|------------------|
| III.2. METODOS | 58 |
| III.2.1. Extracción de médula | 58 |
| III.2.2. Procesamiento de las muestras | 59 |
| III.2.3. Evaluación microscópica | 60 |
| III.3.3. Análisis estadístico | 60 |
| <u>IV. RESULTADOS</u> | <u>62</u> |
| IV.1. Evaluación del efecto de la quimioterapia sobre la eliminación de células tumorales en médula ósea. | 67 |
| IV. 1. 1. Pacientes de tratamiento adyuvante (grupo 1) | 67 |
| a) Frecuencia de detección de células tumorales aisladas en médula ósea | 67 |
| b) Respuesta a quimioterapia | 69 |
| IV. 1. 2. Pacientes con enfermedad metastásica (grupo 2) | 75 |
| a) Frecuencia de detección de células tumorales aisladas en médula ósea | 75 |
| b) Respuesta a quimioterapia | 75 |
| c) Relación con las distintas localizaciones de metástasis | 78 |
| d) Relación de la respuesta a quimioterapia con la respuesta clínica | 79 |
| e) Relación entre la situación inmunocitoquímica medular y la evolución de la enfermedad. | 80 |
| IV. 2. Objetivos secundarios | 88: |
| IV. 2. 1. Pacientes con marcadores tumorales elevados (grupo 3) | 88 |
| a) Frecuencia de detección de células tumorales aisladas en médula ósea | 88 |
| b) Relación entre la situación inmunocitoquímica medular y la evolución de la enfermedad | 88 |
| IV. 2.2. Relación sangre periférica- médula ósea | 89 |

V. DISCUSIÓN **93**

VI. CONCLUSIONES **106**

VII. BIBLIOGRAFÍA **107**

I INTRODUCCIÓN

I. 1. Datos epidemiológicos

El cáncer de mama es la neoplasia maligna más frecuentemente diagnosticada en la mujer (32% de los cánceres femeninos en EEUU y 34% en España), y es la primera causa de muerte por cáncer en la mujer en los países industrializados (en algunos países comienza a ser desplazada por el cáncer de pulmón), y la segunda en Latinoamérica, África y países del continente asiático¹. En España en 1994 supuso el 18.2% de todas las defunciones por cáncer en el sexo femenino, con una tasa de mortalidad de 29.3 por cada 100.000 mujeres. La incidencia oscila entre 20 y 100 nuevos casos por 100.000 mujeres/año, con una gran variabilidad geográfica; en España varía entre 35 y 50 nuevos casos por 100.000 mujeres/año y el riesgo estimado de padecer esta enfermedad es de 1 cada 19 mujeres antes de los 74 años de edad^{2,3}. El riesgo va aumentando con la edad, especialmente durante la etapa premenopáusica. En los últimos años asistimos a un incremento en la incidencia de cáncer de mama, probablemente relacionado con los programas de detección precoz. En Estados Unidos se ha constatado sin embargo una reducción en la mortalidad, atribuida precisamente al diagnóstico en fases tempranas y a los avances en el tratamiento sistémico, a medida que progresa el conocimiento sobre la biología y comportamiento clínico del tumor. Aun así, entre un 35 y 40% de las mujeres diagnosticadas de cáncer de mama recaen y fallecen por la enfermedad a lo largo de la evolución de la misma.

I. 2. Historia natural del cáncer de mama

El comportamiento clínico del cáncer de mama se caracteriza por una historia natural prolongada y por una gran heterogeneidad en la evolución de las pacientes⁴. Estrictamente la historia natural de la enfermedad sólo podría estudiarse en pacientes que no hubiesen recibido tratamiento de ningún tipo, lo cual es difícil porque el cáncer de mama se considera una enfermedad tratable médicamente desde hace más de doscientos años y por tanto son escasas las series bien documentadas de pacientes sin tratamiento. Una de ellas, publicada por Bloom y cols⁵, incluye a 250 pacientes que ingresaron en el Hospital de Middlesex (Inglaterra) entre 1805 y 1933. La mayoría presentaban un estadio localmente avanzado o metastásico (23% estadio III y 74% estadio IV). La mediana de supervivencia fue de 2.7 años desde el comienzo de los síntomas, la

supervivencia a 5 y 10 años del 18 y 4% y el índice anual de mortalidad del 25%. (Fig. 1). Este estudio permite apreciar que en algunas pacientes la supervivencia del cáncer de mama puede ser larga incluso sin recibir ningún tipo de tratamiento. Más recientemente la End Results Section of the Biometry Branch del National Cancer Institute⁶ publicó los datos de supervivencia de una larga serie de pacientes diagnosticadas de cáncer de mama y tratadas, corregidos en función de otras causas de muerte distintas del cáncer de mama. La figura 2 representa la curva lineal de supervivencia relativa, que muestra dos grupos claramente diferenciados de pacientes: uno de ellos, formado por el 60% de las pacientes, presenta una supervivencia superior a 10 años y una tasa anual de mortalidad del 2.5%; el otro está compuesto por pacientes con un curso clínico más agresivo, cuya tasa de mortalidad anual -25%- es semejante a la de la serie del Middlesex Hospital.

El cáncer de mama es, por tanto, una enfermedad de larga evolución y heterogénea en su agresividad biológica, con subgrupos de pacientes de diferente pronóstico. Por esta razón es difícil hablar de curación en esta enfermedad, y se han descrito diferentes acepciones del concepto de curación: curación estadística, curación clínica y curación personal⁴. Un grupo de pacientes tratadas se considera estadísticamente curado si su posterior tasa de mortalidad es igual a la cualquier otro grupo de población normal de la misma edad y sexo. El concepto de curación clínica se refiere a la aparente erradicación de la enfermedad en un individuo, de modo que tiene el mismo riesgo de muerte por cáncer de mama que otra persona de su edad y sexo. La curación personal indica que una paciente concreta vive el resto de su vida sin síntomas de cáncer de mama y fallece por otra causa.

Todos los estudios que intentan evaluar el índice de curación estadística en cáncer de mama tras el tratamiento establecen un riesgo de mortalidad persistentemente superior al esperado para la población normal. Las curvas de supervivencia no llegan a coincidir en ningún momento, como demostraron Brinkley y Haybittle⁷ en su serie de 704 pacientes del área de Cambridge (fig. 3), con un seguimiento mínimo de 31 años. Si bien la curva se aplan a los 10 años del diagnóstico, se han descrito recaídas y muertes por cáncer de mama incluso treinta años después del diagnóstico⁸. El riesgo de recaída y muerte va decreciendo a lo largo de los años que transcurren desde el diagnóstico, pero nunca llega a ser nulo, ni siquiera en los grupos considerados de mejor

pronóstico, como han demostrado los estudios sobre probabilidad anual (annual hazard) de recurrencia, con medianas de seguimiento mayores de 12 años⁹. Nosotros mismos hemos podido comprobarlo en un grupo de 1972 pacientes tratadas en el Hospital Clínico de Valencia entre 1982 y 1996¹⁰ (fig. 4): el riesgo de recaída es mayor en los primeros dos años, pero se mantiene incluso 10 años después del diagnóstico.

Sin embargo hay un porcentaje de pacientes que llegan a estar “personalmente” curadas: 26 % en la serie de Brinkley y Haybittle y 21% en la experiencia del Memorial Sloan-Kettering Cancer Center publicada por Adair y cols¹¹. Es factible además establecer grupos con mejor o peor pronóstico en función de distintos factores. Clásicamente se ha establecido el pronóstico teniendo en cuenta dos factores principales: el tamaño del tumor y el grado de afectación de los ganglios axilares, que desde hace más de 100 años se consideran la primera vía de diseminación del cáncer de mama. Rosen y cols¹² publican los resultados en 382 pacientes con cáncer de mama y ganglios negativos, en función del tamaño tumoral y con un seguimiento mediano de 18.2 años. 80% de pacientes con tumores de tamaño igual o menor a 1 cm, y 70% de las pacientes con tumores de 1.1-2 cm están libres de enfermedad a largo plazo. Un estudio cooperativo promovido por la Universidad de Arizona¹³, que recogió datos de pacientes tratadas en varias instituciones (Instituto de Tumores de Milán, M.D.Anderson Cancer Center, Royal Marsden Hospital y centros americanos adscritos al grupo SWOG) analizó una serie de 2578 pacientes con cáncer de mama, de las cuales 1014 -que presentaban un estadio II con afectación ganglionar- fueron tratadas únicamente con cirugía y radioterapia. Este grupo se comparó con el grupo de pacientes que recibieron diferentes regímenes de quimioterapia adyuvante. El estudio estratificó a todas las pacientes en varios grupos, en función del número de ganglios afectos. Las curvas de supervivencia publicadas, que demuestran menor probabilidad de supervivencia cuanto mayor es la afectación ganglionar, son clásicas en la descripción de la historia natural y factores pronósticos en el cáncer de mama (Fig. 5).

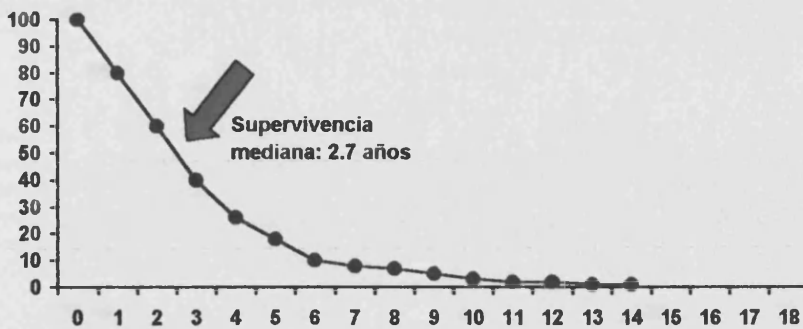


FIG. 1.- Supervivencia de 250 pacientes con cáncer de mama no tratado. Serie de Middlesex Hospital (Modificado de: Bloom HJG et al. Natural history of untreated breast cancer [1805-1933]. *BMJ* 1962; 2: 213)⁵.

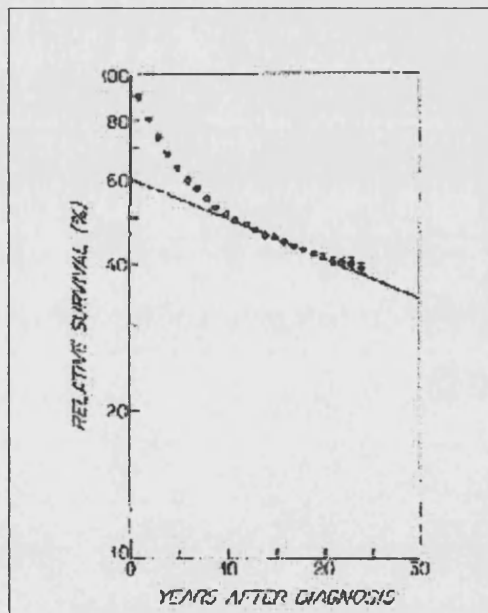


FIG. 2.- Supervivencia relativa de las pacientes con cáncer de mama (todos los estadios) del End Results Section, Biometry Branch, National Cancer Institute, 1977 (Fox MS. On the diagnosis and treatment of breast cancer. *JAMA* 1979; 241: 489)⁶

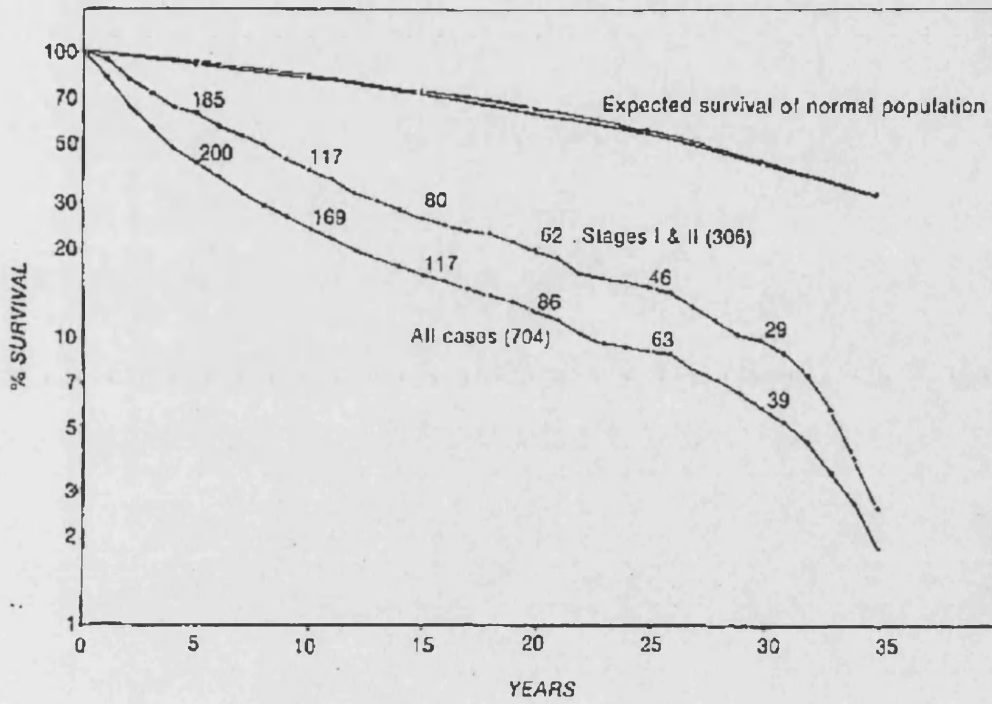
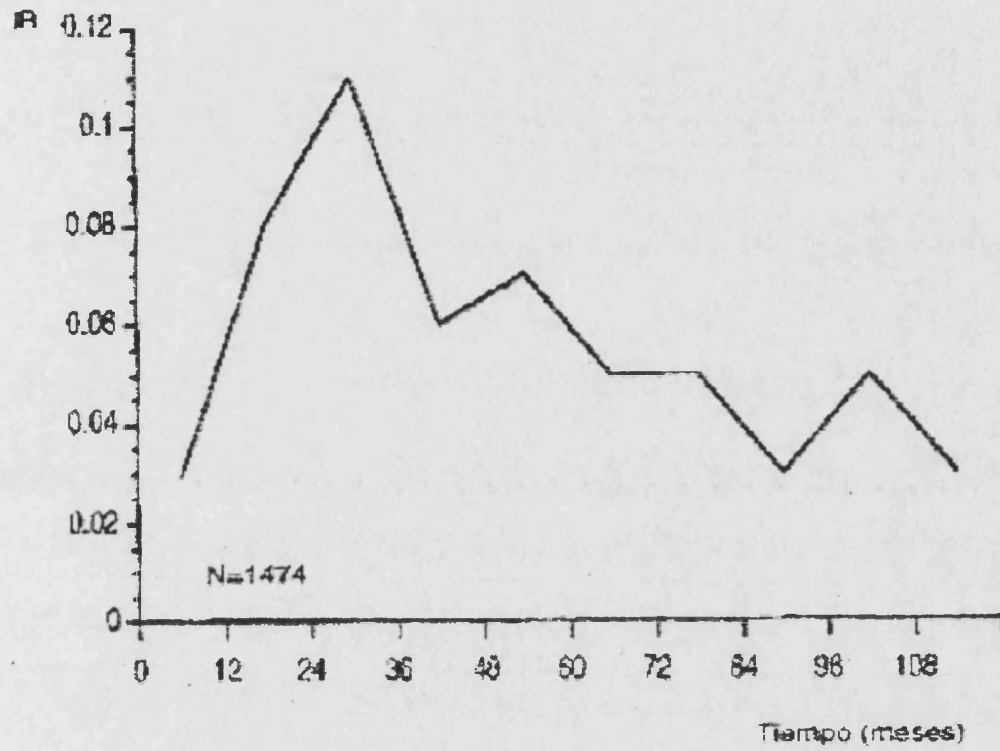


FIG. 3.-Curva de supervivencia de 704 pacientes con cáncer de mama tratadas entre 1947 y 1950 y observadas durante 31 años, comparada con la curva de supervivencia de la población normal. (Brinkley D, Haybittle JL. Long term survival of women with breast cancer. Lancet 1984; 1: 1118)



PERSONAS EN RIESGO POR INTERVALO
 1474 1262 1045 808 630 512 395 289 220 167

FIG. 4.- Índice de riesgo anual de recaída en el grupo global de 1972 pacientes tratadas en el Hospital Clínico de Valencia entre 1982 y 1986. (Azagra P et al. Natural history of breast cancer. Annual hazard of recurrence after surgery. Eur J Cancer 1998; 34 [Supl 2]: 6)¹⁰

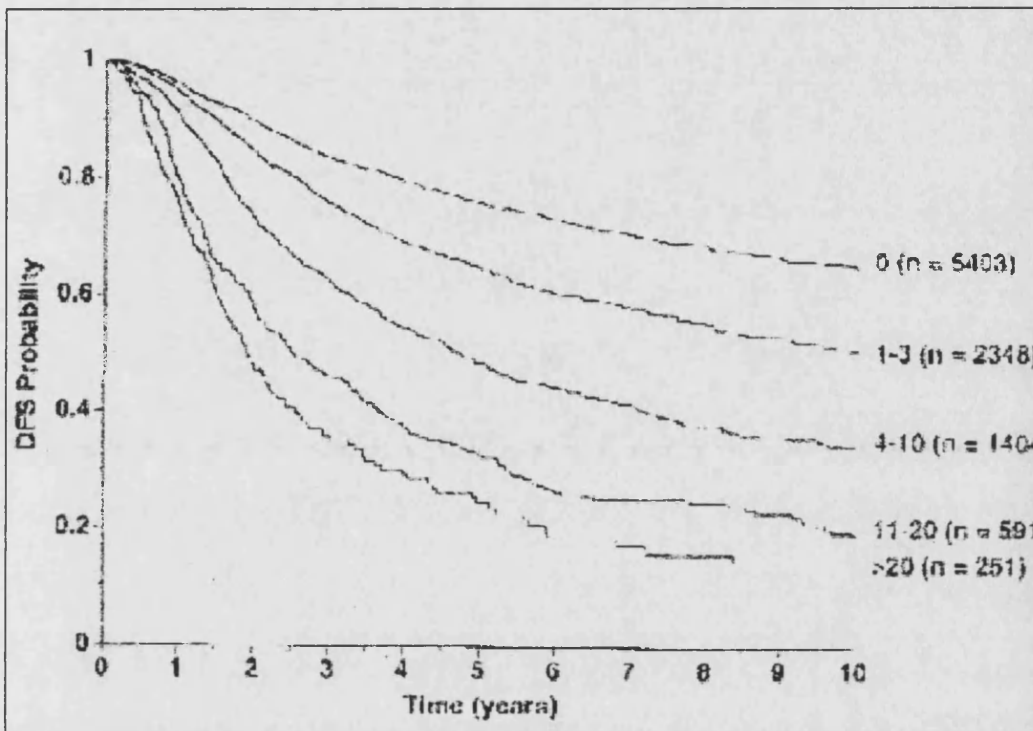


FIG. 5.- Probabilidad de supervivencia global y libre de enfermedad en pacientes con cáncer de mama en relación con la afectación ganglionar (Modificado de Jones SE et al¹³: Comparison of different trials of adjuvant chemotherapy in stage II breast cancer using a Natural History Data Base. Am J Clin Oncol 1987; 5:387-395) .

I.3. Bases teóricas para el tratamiento del cáncer de mama

Históricamente el tratamiento del cáncer de mama ha experimentado variaciones, de acuerdo con la evolución de los conocimientos acerca de la biología y desarrollo tumoral¹⁴.

Inicialmente se aceptó el modelo halstediano, que consideraba el cáncer de mama una enfermedad localizada, y los ganglios linfáticos una barrera defensiva frente al tumor. Según este modelo, el cáncer aparecía primariamente en la mama y se extendía por contiguidad hasta los ganglios y desde ahí a las diferentes localizaciones de metástasis. La estrategia terapéutica se orientó por tanto al control local de la enfermedad, con procedimientos quirúrgicos ampliamente mutilantes.

El hecho de que la eficacia del tratamiento quirúrgico no fuese completa, ni siquiera en tumores localizados, condujo en la década de los 50-60 a la aparición de una segunda hipótesis, presentada por Keynes y Crile y completada por B. Fisher¹⁵, según la cual el cáncer de mama era una enfermedad sistémica desde el inicio, con capacidad de diseminación ganglionar y hematógena. Incluso los tumores de pequeño tamaño se consideraban una manifestación temprana de la enfermedad sistémica y la afectación ganglionar equivalente a enfermedad a distancia. Este modelo restó importancia al control local en el tratamiento de la enfermedad, y sobre esta base se realizaron dos grandes estudios aleatorizados que comparaban diferentes tratamientos loco-regionales (mastectomía radical, mastectomía simple más radioterapia locoregional, mastectomía y vaciamiento axilar en función de la afectación clínica, lumpectomía sola o con irradiación local), sin encontrar diferencias en supervivencia global ni en supervivencia libre de enfermedad después de 14 y 9 años de seguimiento^{16, 17}.

Apoyados en este modelo se han desarrollado también los estudios de quimioterapia adyuvante y neoadyuvante, para erradicar las células tumorales que puedan pasar al torrente sanguíneo durante la cirugía, en el primer caso, o para minimizar el número de células resistentes a quimioterapia que aparecen con el crecimiento del tumor, y permitir además una cirugía menos agresiva en el segundo. El efecto beneficioso de la hormonoterapia y de la quimioterapia adyuvante en el tratamiento del cáncer de mama ha sido confirmado por numerosos estudios, así como por el metaanálisis llevado a cabo por el Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group¹⁸ sobre 33 ensayos randomizados

con 75000 pacientes. El tratamiento sistémico tras la cirugía reduce el riesgo de recaída y muerte, y aunque la reducción es modesta supone en total un número importante de pacientes, dada la incidencia del cáncer de mama en los países desarrollados.

Frente a la tesis anterior hay sin embargo argumentos de peso, como la comprobada reducción en mortalidad que han supuesto los programas de diagnóstico precoz al permitir la detección y tratamiento de la enfermedad en estadios tempranos, así como la demostración de que el pronóstico del cáncer de mama está en función del tamaño tumoral y de la afectación ganglionar. Por este motivo se ha postulado una tercera hipótesis, sostenida por Harris y Hellman^{4, 14}. El cáncer de mama sería una enfermedad heterogénea que abarca un espectro amplio de posibilidades, con una mayor proclividad a metastatizar en función del tamaño tumoral, aunque para cualquier tamaño hay una proporción de pacientes metastásicas, así como una proporción de pacientes con enfermedad localizada. La afectación ganglionar puede ser un marcador de riesgo de enfermedad a distancia, pero también puede ser el único sitio de metástasis en muchas pacientes. Unos tumores permanecerán localizados, otros metastatizarán en función del tamaño y de la extensión locorregional, y otros probablemente presentan ya metástasis ocultas en el momento del diagnóstico, los cuales no son controlables con tratamiento exclusivamente local. El mensaje terapéutico de esta hipótesis es la necesidad de seleccionar para el tratamiento adyuvante o para tratamientos sistémicos a aquellas pacientes que no resultarían curadas por el tratamiento local, para no “sobretreatar” ni “infratreatar” a ninguna. Esto implica conocer mejor la biología y mecanismos de crecimiento y diseminación tumoral, y apoya la realización de estudios sobre factores pronósticos, que permitan una orientación terapéutica lo más ajustada posible al riesgo de recaída.

I.4. Factores que influyen en el pronóstico del cáncer de mama

Ya que no ha sido posible hasta ahora la identificación por métodos directos de los pacientes que desarrollarán metástasis a distancia, se han ido describiendo los llamados factores pronósticos, que indirectamente predicen el riesgo de recaída. Se trata de rasgos clínico-biológicos del tumor estadísticamente asociados a una mejor o peor evolución clínica. Aunque incluimos todos estos factores dentro del término de “factores pronósticos”, conceptualmente diferenciamos los verdaderos factores pronósticos, que describen la historia

natural de un paciente con cáncer de mama en estadio inicial y se asocian a un mayor riesgo de recidiva o muerte por cáncer cuando no se aplica ningún tratamiento sistémico adyuvante, y los factores predictivos, que definen la probabilidad de respuesta a un tipo particular de tratamiento. Hasta el momento se han aceptado diferentes factores pronósticos clínicos, histológicos y biológicos¹⁹, todos los cuales cumplen los criterios del American Joint Committee on Cancer (AJCC)²⁰: significación estadística, independencia de otros factores y relevancia clínica, aunque unos están mejor documentados clínica y biológicamente que otros. La investigación continua ha permitido consagrar una serie de factores, que se utilizan en la clínica para orientar el tratamiento y seguimiento de las pacientes, mientras que otros son todavía promesas o realidades poco constatadas.

I.4.1. Factores pronósticos clásicos:

Los factores clásicamente reconocidos y utilizados en la clínica son principalmente la afectación ganglionar axilar, el tamaño del tumor, el grado de diferenciación, la expresión de receptores hormonales y, más dudosamente, la edad. Factores también reconocidos pero menos utilizados clínicamente son el porcentaje de células en fase S, la ploidía tumoral y la expresión de Ki-67 como factores de proliferación.

El factor pronóstico más establecido es el número de ganglios axilares positivos tras una disección axilar y un minucioso examen histológico de todas las adenopatías aisladas. Los ganglios axilares son el drenaje linfático regional más importante de la mama, con una frecuencia de afectación de casi un 50% al diagnóstico, porcentaje que está disminuyendo gracias a los programas de detección precoz. Anatómicamente se divide la axila en tres niveles: nivel I, o proximal, situado por fuera del borde inferior del músculo pectoral menor; nivel II, que comprende el tejido situado inmediatamente por debajo del pectoral menor, y nivel III o distal, que se sitúa por encima del pectoral menor. La radicalidad de la disección axilar ha sido un tema controvertido en cuanto a su función diagnóstica, pronóstica o terapéutica, como se ha comentado, con autores que defienden la necesidad absoluta de una linfadenectomía completa hasta el tercer nivel²¹ mientras otros mantienen que es suficiente la disección de los niveles I y II²². Los resultados del ensayo de Fisher y cols¹⁶, que no muestran diferencias significativas entre tres diferentes tratamientos loco-regionales, han llevado a aceptar la resección de los niveles I y II, que generalmente conlleva la

exéresis de 10 o más adenopatías, límite admitido para una adecuada aproximación pronóstica.

Conforme se incrementa el número de ganglios axilares infiltrados (o positivos) mayor es el riesgo de recidiva y se reduce la probabilidad de supervivencia²³. La serie de Valagussa y cols²⁴, que incluye pacientes con cáncer de mama tratadas con mastectomía radical, muestra una supervivencia global a los diez años de un 80% en las pacientes sin afectación ganglionar frente a un 38% en las que presentan ganglios axilares afectados. También dentro del grupo de pacientes con afectación ganglionar hay diferencias según el número de ganglios afectados¹³: las pacientes a menudo se agrupan según tengan “ganglios negativos”, “de 1 a 3 ganglios positivos”, “de 4 a 9 ganglios positivo”s o “10 o más ganglios afectados”. En pacientes con afectación de 1 a 3 ganglios, más del 50% habrán presentado recurrencias a los 10 años de una mastectomía radical. Las pacientes con más de 10 ganglios tienen una incidencia de recidivas superior al 85% en el décimo año.

El tamaño tumoral, una de las primeras variables cuantificadas con precisión, constituye también un valioso factor pronóstico. El tamaño tumoral se refiere a la longitud máxima del componente invasivo medido en las secciones microscópicas. Aunque se correlaciona bien con el número de ganglios axilares positivos, tiene valor pronóstico independiente, y es particularmente útil en definir el pronóstico de las pacientes con ganglios negativos^{13, 25}. Así, las pacientes con ganglios negativos y un tamaño tumoral inferior a 1 cm tienen un pronóstico más favorable (menos de un 10% de recidivas) frente a un 17% de recaídas si el tumor tiene un tamaño de 2-3 cm. Las pacientes con tumores mayores de 5 cm (independientemente de su afectación ganglionar axilar) tienen una frecuencia de recidiva que sobrepasa el 70% a los 10 años²⁶.

El grado de diferenciación del tumor, o grado histológico, ha demostrado ser un importante factor pronóstico²⁷. Su utilidad se ha visto limitada por su pobre reproductibilidad^{28, 29}. Las clasificaciones más usadas son las de Scarff-Bloom-Richardson y el grado nuclear de Fisher, aunque ambos sistemas son frecuentemente usados en versiones modificadas³⁰. El primero establece tres grados de diferenciación basándose en criterios morfológicos (tendencia del tumor a organizarse, pleomorfismo celular y número de mitosis), siendo los tumores mejor diferenciados (grado I) los que se correlacionan con un mejor

pronóstico, mientras que los más indiferenciados (grado III) se comportan de forma más agresiva.

Otros factores histopatológicos como la invasión vascular y linfática y la presencia de necrosis han sido descritos como importantes factores pronósticos en series individuales, pero igualmente limitadas por su escasa reproductibilidad.

Entre los factores clínicos, la edad joven –inferior a 35 años- al diagnóstico de esta enfermedad ha sido descrita como un factor pronóstico adverso^{31, 32}, aunque su valor ha sido controvertido al asociarse a otros factores pronósticos adversos (v.g. mayor afectación ganglionar). Nuestro grupo comprobó, en una serie de 1929 pacientes diagnosticadas de cáncer de mama en estadios I a III y tratadas en nuestra institución, que la edad inferior a 37 años es un factor de mal pronóstico para la supervivencia global y libre de enfermedad, independiente de otros factores³³. En la 6ª Conferencia Internacional sobre Terapia Adyuvante en Cáncer de Mama (1998), se reconoció por primera vez la edad joven como un factor pronóstico adverso independiente³⁴.

De los parámetros bioquímicos, el más importante es la presencia o ausencia de receptores estrogénicos y receptores de progesterona en el tumor³⁵, que actualmente se miden por métodos inmunohistoquímicos y que pueden realizarse en muestras de muy pequeño tamaño. Alrededor del 60% de los cánceres de mama expresan receptores estrogénicos, y su presencia confiere un pronóstico más favorable, sobre todo para la supervivencia libre de enfermedad en los primeros 5 años³⁶. Esto sugiere que el estado de receptor estrogénico positivo es una medida de la capacidad proliferativa del tumor, más que de su capacidad de metastatización. La presencia de los receptores de progesterona (RP) es también un factor pronóstico favorable, y los tumores que contienen RP tienen un menor índice de metástasis. La asociación de ambos receptores mejora el pronóstico. La determinación del estado de los receptores hormonales tiene una importancia crítica como factor predictivo de respuesta a la terapia hormonal. En nuestro grupo, Azagra^{37, 38} demostró con un estudio retrospectivo, que incluyó 1474 pacientes tratadas en nuestra institución con un seguimiento mediano de 70 meses, el valor pronóstico independiente de los receptores hormonales, especialmente de los receptores de progesterona, en la supervivencia global y libre de enfermedad del cáncer de mama.

Los parámetros biológicos que miden la proliferación celular del tumor también han sido objeto de evaluación como posibles factores pronósticos¹⁹. Entre estos se incluyen el índice mitótico, el índice de captación de la timidina, el grado de ploidía y la fracción de células en fase S (estos dos últimos obtenidos por citometría de flujo), y algunos anticuerpos dirigidos contra antígenos asociados al ciclo celular³⁹. El pronóstico de los tumores que muestran una alta actividad proliferativa es peor que el de los tumores más quiescentes. El valor de estos factores no está claramente establecido, por la dificultad de estandarización y homogeneización de las técnicas.

I.4.2. Nuevos factores pronóstico

Más recientemente se van sumando nuevos factores que exploran el proceso de oncogénesis y la diseminación tumoral: Existe actualmente un interés creciente en investigar el valor pronóstico del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico HER-2/neu (también denominado c-erbB-2). Este oncogen se localiza en el cromosoma 17q21 y codifica una glicoproteína de 185 kD con un dominio transmembrana (receptor HER-2) cuya sobreexpresión se asocia a un crecimiento tumoral más agresivo⁴⁰. El estado HER-2 positivo (detectado en el 20-30% de las pacientes, mediante FISH o inmunohistoquímica) tiene, por tanto, un impacto negativo en la supervivencia de las pacientes con carcinoma de mama, especialmente en las que existe afectación ganglionar. Además HER-2 puede ser un útil factor predictivo⁴¹, ya que las pacientes cuyos tumores expresan altos niveles de HER-2 se benefician de una mayor sensibilidad a los regímenes de quimioterapia que contienen antraciclinas⁴².

Hay una larga lista de otros posibles factores pronósticos en investigación, aunque ninguno ha sido verificado para su uso rutinario en la práctica clínica, incluyendo la presencia de enzimas proteolíticas como la catepsina B y D, metaloproteinasas, activadores de plasminógeno, o de proteínas que facilitan la adhesión a la membrana basal, como la molécula de adhesión de las células epiteliales EpCAM, las integrinas⁴³, etc.

Todos estos elementos reflejan la agresividad tumoral y por tanto la probabilidad de que el tratamiento local no consiga erradicar la neoplasia, por la existencia de microdiseminación previa, traducida en enfermedad residual subclínica. La información que aportan estos factores ha permitido identificar subgrupos de pacientes con mayor riesgo, a los que se han dirigido los

tratamientos más enérgicos, pero aun dentro de los grupos considerados de buen pronóstico hay un porcentaje considerable de recaídas y muertes por cáncer^{8, 12}. Para estas pacientes el tratamiento aplicado ha sido insuficiente, quizá porque la ausencia de marcadores de mal pronóstico no ha permitido reconocer el riesgo. El otro gran obstáculo que encontramos es la imposibilidad de conocer a priori la eficacia del tratamiento adyuvante por no disponer de métodos fiables que pongan de manifiesto la enfermedad subclínica y su respuesta a los tratamientos.

I.5. El concepto de enfermedad micrometastásica o enfermedad mínima residual

La enfermedad mínima residual es un concepto desarrollado principalmente en neoplasias hematológicas, definido por la persistencia de enfermedad subclínica tras el tratamiento, llamada enfermedad mínima, sólo detectable por técnicas sofisticadas y cada vez más sensibles, que antes o después causa una recaída clínicamente manifiesta.

Hace más de 100 años se describió por primera vez la presencia en sangre periférica de células tumorales procedentes de neoplasias epiteliales, detectadas al microscopio óptico con técnicas rutinarias⁴⁴. Desde entonces se ha debatido ampliamente el significado clínico de las células tumorales circulantes, aunque hasta hace 20 años, debido a las dificultades en la detección, no se había considerado relevante este hallazgo.

En los últimos años sin embargo se ha revalorizado su importancia y se han desarrollado enormemente las técnicas de detección, buscando poner de manifiesto metástasis microscópicas ocultas a técnicas convencionales⁴⁵. Los estudios se han focalizado en la sangre periférica, como medio de transporte de las células circulantes, y en la médula ósea como posible lugar de alojamiento de las mismas, por dos razones: por un parte se ha extrapolado de las neoplasias hematológicas el concepto de enfermedad mínima residual, a medida que se generalizó el uso clínico de la quimioterapia intensiva con soporte hematopoyético para el tratamiento de tumores sólidos. La posibilidad de infundir productos contaminados con células tumorales llevó a investigar diferentes métodos de detección de las mismas. Por otra parte, con el estudio de los mecanismos de recidiva tumoral se ha ido consolidando la hipótesis, esquematizada en la figura 6, de la posible microdiseminación antes, durante o después de la cirugía, es decir, la liberación de células aisladas al torrente

circulatorio, que tras acantonarse en la médula ósea darían lugar posteriormente a las metástasis a distancia⁴⁶. Estas células no son detectadas por las exploraciones convencionales utilizadas para el estudio de extensión en el momento del diagnóstico y permanecen clínicamente ocultas como enfermedad mínima residual tras el tratamiento. Dado que el objetivo del tratamiento adyuvante es destruir el foco tumoral subclínico más pequeño que exista, resulta del mayor interés la identificación de células tumorales ocultas para investigar su papel en el proceso de diseminación tumoral e intentar su eliminación en caso de que se demuestre esta influencia.

Con los nuevos procedimientos de laboratorio se han podido detectar células neoplásicas aisladas en médula ósea, y en menor medida en sangre periférica, en pacientes con tumores sólidos de stirpe epitelial, tanto en estadios avanzados como en fases precoces^{47, 48}. Esto ha despertado gran interés, aunque su significado clínico aún es poco conocido, por la información que puede aportar sobre los mecanismos de desarrollo neoplásico y por la posibilidad de identificar nuevos factores pronósticos que permitan un tratamiento más ajustado al riesgo de recaída. De hecho se ha postulado ya –quizá algo precozmente– la inclusión de esta característica como factor pronóstico facultativo dentro de la clasificación por estadios de la UICC (TNM). Un objetivo prioritario de la investigación en este campo es determinar la técnica óptima de detección, con mayor sensibilidad y especificidad, menor coste e inversión de tiempo y mayor facilidad de reproducción y comparación de resultados, que permita estudiar fiablemente el valor pronóstico y las implicaciones clínicas de este hallazgo.

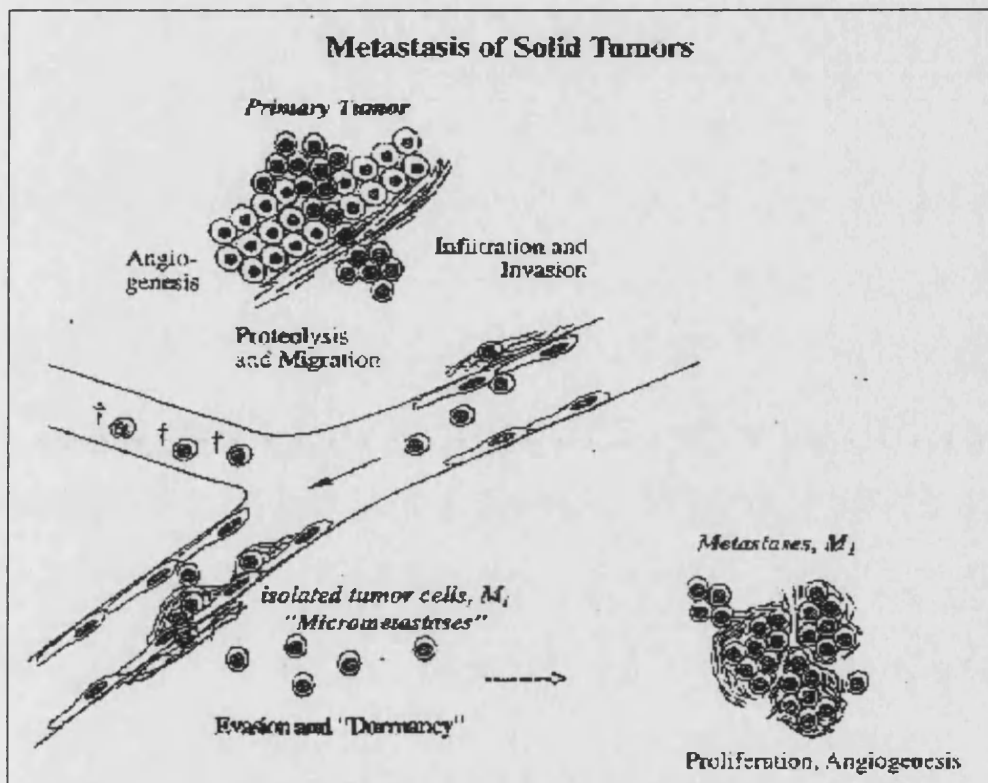


FIG. 6.- Metastatización de los tumores sólidos: las células abandonan el tumor primario como resultado de la proteolisis, invaden el sistema circulatorio y migran a nuevas localizaciones, donde se establecen tras adherirse y atravesar la pared vascular de los capilares. En estos sitios las células pueden sobrevivir muchos años en forma de micrometástasis, es decir, de células aisladas o pequeños grupos celulares que no detectan las exploraciones convencionales. En algún momento las células proliferan, estimulan la angiogénesis y son capaces de formar metástasis en los distintos órganos (Pantel et al, J Natl Cancer Inst 1999; 91, 1114)⁴⁹.

I.6. Procedimientos de detección de células tumorales ocultas en tumores de estirpe epitelial

En 1980 investigadores del Royal Marsden Hospital y del Instituto Ludwig de Londres comunicaron por primera vez la posibilidad de detectar células epiteliales extrínsecas en médula ósea de pacientes con cáncer de mama mediante el uso de anticuerpos frente al antígeno epitelial de membrana (EMA)^{50, 51}, que permitía diferenciar células hematopoyéticas de células epiteliales. Hasta entonces la investigación en este campo no había alcanzado especial importancia, dado que en fases precoces los métodos estándar raramente conseguían poner de manifiesto células aisladas (Ridell y Landys encontraron un 3-7% de células tumorales en médula ósea de pacientes con cáncer de mama no metastásico^{52, 53}). En los últimos años, sin embargo, se han desarrollado métodos de laboratorio de tipo inmunológico o molecular, dirigidos a localizar proteínas celulares o fragmentos de ácidos nucleicos amplificados, que han conseguido identificar células tumorales en médula ósea en un porcentaje elevado de casos. Las técnicas más frecuentemente utilizadas han sido la determinación inmunocitoquímica de marcadores de superficie o citoplasmáticos, la inmunofluorescencia, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y, en menor medida, el cultivo celular^{54, 55}, como indica la tabla 1.

TABLA 1.- Sensibilidad de las técnicas utilizadas para detectar células tumorales ocultas en MO (modificado de Ross A, 1998)⁴⁵

| Técnica | Sensibilidad | Especificidad |
|------------------------|--|---------------|
| Citología convencional | 1-5: 10 ³ | Alta |
| Inmunocitoquímica | 1: 10 ⁵ a 1:10 ⁶ | Alta |
| Citometría de flujo | 1: 10 ⁴ a 1:10 ⁷ | Baja |
| Cultivos celulares | Variable | Alta |
| PCR | 1: 10 ⁵ a 1:10 ⁷ | Baja |

I.6.1 Inmunocitoquímica

Actualmente la mayoría de los estudios utilizan métodos inmunocitoquímicos, que han demostrado utilidad clínica y elevada sensibilidad y especificidad⁵⁶, como procedimiento base o como referencia para la detección de células tumorales ocultas en médula ósea o sangre periférica, o en otros tejidos como ganglios linfáticos. La técnica se basa en el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra marcadores celulares específicos, como el

antígeno epitelial de membrana (EMA), mucinas o diferentes citoqueratinas. Es laboriosa y requiere experiencia, pero se ha preferido antes que otras porque permite verificar la detección mediante evaluación morfológica de las células teñidas. Más adelante nos ocuparemos de ella con detenimiento.

I.6.2. Citometría de flujo

Consiste en el análisis automático mediante inmunofluorescencia de células marcadas con complejos de anticuerpos monoclonales y fluorocromos⁵⁴. El ordenador acumula y analiza en poco tiempo la información recibida de las señales emitidas por millones de células. Las ventajas de esta técnica son la fácil reproducibilidad, la rapidez de procesamiento y la posibilidad de analizar múltiples parámetros simultáneamente. La desventaja estriba en la escasa sensibilidad cuando el número de células tumorales es bajo (menor de 1: 10.000 células mononucleadas), además de que no diferencia células tumorales de células normales falsamente teñidas, por lo que en cualquier caso sería necesaria la evaluación microscópica manual. Estas dificultades pueden ser solventadas en un futuro enriqueciendo las muestras mediante separación inmunomagnética⁵⁷ y seleccionándolas mediante un analizador automático, que las localice para su revisión morfológica (ACIS; Chroma Vision Medical Systems, San Juan Capistrano, California)⁵⁸.

I.6.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR ha sido ensayada ampliamente en tumores sólidos desde 1990, en que Smith y cols comunicaron la detección de células de melanoma en sangre periférica con este método⁵⁹. No puede emplearse aquí la misma aproximación que en las neoplasias hematológicas, al no disponer por el momento de marcadores genéticos específicos para casi ningún tumor sólido, de modo que se utiliza la técnica de PCR reversa (RT-PCR) para rastrear la presencia de células malignas aisladas, identificadas mediante secuencias de genes de productos tisulares como citoqueratinas, mucinas, factor de crecimiento epidérmico y otras proteínas^{60, 61, 62, 63}. La sensibilidad es incluso mayor que la de la inmunocitoquímica (detecta 1 célula tumoral por cada 10 millones de células mononucleadas), y puede realizarse con más rapidez y coste más moderado, pero el inconveniente por ahora es la dificultad para cuantificar las células detectadas y para homogeneizar los resultados de los distintos grupos, así como la baja especificidad (mayor frecuencia de falsos positivos)^{64, 65}, atribuible a

contaminación de las muestras, presencia de inhibidores en la propia muestra y también a la expresión de proteínas específicas por células no neoplásicas⁶⁶.

1.6.4. Cultivos celulares

El cultivo celular es otro método de detección, comunicado por primera vez por Hamburger y Salmon en 1978⁶⁷, que analiza el crecimiento in vitro de las colonias tumorales. Varios investigadores han utilizado una modificación de este método para cultivar colonias neoplásicas procedentes de médula ósea o de sangre periférica y así determinar su potencial de crecimiento⁶⁸. Se ha visto así que las colonias pueden crecer incluso cuando la contaminación tumoral es tan baja como 1 célula por cada 2 millones de células hematopoyéticas normales, aunque también se ha comunicado que el potencial proliferativo es limitado en el tiempo⁶⁹ y que con frecuencia las células permanecen quiescentes. Teóricamente es la técnica más adecuada, al ser la única que permite medir la viabilidad y capacidad clonogénica de las células tumorales, pero no es fácilmente reproducible ni utilizable con un número elevado de muestras, pues necesita entre 4 y 8 semanas de cultivo en condiciones muy especiales; con la consiguiente facilidad de contaminación y la dificultad en diferenciar si la falta de crecimiento se debe a malas condiciones del medio o a la ausencia de células.

La inmunocitoquímica es por ahora el método estándar de detección de micrometástasis en médula ósea, sangre periférica y ganglios linfáticos^{55, 49}, con capacidad para identificar una célula tumoral por cada dos millones de células mononucleadas, mientras que las otras técnicas continúan considerándose experimentales.

I.7. Detección de células tumorales ocultas mediante inmunocitoquímica

I.7.1. Procedimiento y controversias en torno al mismo

La inmunocitoquímica utiliza anticuerpos monoclonales que se unen a antígenos tumorales pero no a células del tejido circundante, de modo que las células “marcadas” pueden ser puestas de manifiesto mediante alguna técnica de tinción, con una enzima que reacciona con un agente colorante. En el caso de la búsqueda de células tumorales ocultas en médula ósea, sangre o ganglios linfáticos la clave está en seleccionar anticuerpos específicos para antígenos epiteliales, no expresados por las células hematopoyéticas, que reconocen células

epiteliales extrínsecas en estos órganos. La técnica de revelado más utilizada es la de fosfatasa alcalina-antifosfatasa alcalina (FAAFA). Las células teñidas son fácilmente reconocibles mediante observación microscópica, que permite diferenciar células neoplásicas de células falsamente positivas por su aspecto morfológico. En conjunto es un método costoso, tanto desde el punto de vista económico como por el tiempo que requiere, pero hasta el momento es el más sensible y específico^{51, 56, 70}, y por eso se considera el estándar y modelo para comparar con el resto de procedimientos, a pesar de lo cual los resultados obtenidos difieren considerablemente entre los distintos grupos. En consecuencia, y aunque el número de trabajos y por tanto el total de pacientes estudiadas es numeroso, no ha sido fácil extraer conclusiones fiables para su aplicación clínica.

Entre los distintos estudios publicados hay diferencias llamativas tanto en la frecuencia de detección de células micrometastásicas ocultas (que varía entre un 2 y un 60%, aunque en los últimos estudios, más homogéneos y con mayor número de pacientes, se va concretando en torno a un 30-40%) como en el valor pronóstico de este hallazgo, que para algunos autores es un factor pronóstico independiente y fuertemente asociado a mayor riesgo de recaída y muerte, mientras que para otros no influye lo más mínimo en el pronóstico. La disparidad en los resultados se ha atribuido a la diversidad metodológica⁷¹: distintos números de muestra, distintos anticuerpos con variable sensibilidad y especificidad, diferencias en la cantidad de material analizado, número de localizaciones de extracción de médula, el momento de la extracción en relación con la cirugía, etc, y también a una considerable variedad interpersonal al leer las preparaciones. En el experimento llevado a cabo por el European Working Group for Standardization of Tumor Cell Detection de la International Society of Hematotherapy and Graft Engineering (ISHAGE) se detectaron discrepancias entre los siete laboratorios que participaron, tanto en el número de células consideradas positivas en cada preparación como en la fracción de muestras positivas y negativas⁷².

Como consecuencia este grupo ha publicado unas recomendaciones básicas para la estandarización de la técnica inmunocitoquímica de detección de células tumorales en médula ósea y sangre periférica⁷². Basadas en la bibliografía, estas normas especifican el número de localizaciones de punción recomendado (al menos dos puntos), la cantidad de material que se debe aspirar (40 cc), el número

mínimo de células para estudiar (4×10^6 , la mitad incubadas con el anticuerpo específico y la otra mitad con el control inespecífico) y el tipo de anticuerpo que parece más sensible y específico (anti-citoqueratinas), así como pautas para evaluar la calidad técnica de las preparaciones y categorizar las células teñidas, diferenciando las claramente neoplásicas de las claramente negativas, dudosas y artefactos. La exhaustividad de las recomendaciones dificulta el procedimiento, que ha sido descrito algo más sencillamente en las publicaciones más recientes⁷³

La utilización de anticuerpos frente a citoqueratinas 8, 18 y 19, típicas de estructuras epiteliales de naturaleza glandular, parece ofrecer mayor sensibilidad y especificidad que otros, como el anti-EMA o anti-mucinas, que tienen más probabilidad de reaccionar con células hematopoyéticas. La literatura describe reacciones cruzadas de los anticuerpos anti-EMA y antimucina con células plasmáticas o con precursores mieloides. En teoría tampoco se puede excluir la expresión de citoqueratinas por células mesenquimales, pero numerosos hallazgos negativos en pacientes sin enfermedad neoplásica conducen a pensar que la expresión de citoqueratinas en las células normales dentro de la MO es extremadamente rara, y no detectable por inmunocitoquímica⁷⁴. Las células falsamente positivas generalmente son células epiteliales de origen epidérmico, fácilmente distinguibles de las células neoplásicas

El momento de la detección, antes o después de la cirugía, se ha debatido ampliamente. Hay algunos trabajos que muestran un aumento de la diseminación de células tumorales a la circulación sistémica durante la cirugía, pero no hay evidencia de que esto se relacione con peores resultados clínicos. Weitz y cols analizan mediante PCR muestras de sangre de pacientes con cáncer de colon y detectan células tumorales en 30 de 65 pacientes, de los cuales la mitad sólo presentó células circulantes en las muestras tomadas durante o después de la cirugía⁷⁵. Molino y cols, sin embargo, encuentran células inmunocitoquímicamente positivas en médula ósea de pacientes con cáncer de mama en una proporción de 37% si el aspirado es obtenido inmediatamente antes de la cirugía y en un 17% si se extrae varias semanas después, postulando que quizá las células en médula ósea sean más bien células circulantes atrapadas en los sinusoides medulares⁷⁶. Para otros autores las tasas de detección pre y post-cirugía son comparables⁷⁷. Por ahora no hay ninguna recomendación especial sobre esto; la elección del momento más adecuado se subordina a la organización interna de cada institución.

Se investiga también sobre la importancia de realizar varias extracciones repetidas, en diferentes momentos del seguimiento. Heiss y cols demostraron el importante valor pronóstico de las determinaciones repetidas en pacientes con cáncer gástrico⁷⁸. En pacientes con cáncer de mama, Molino y cols⁷⁹ apreciaron que la frecuencia de aspirados “positivos” al realizar tres determinaciones seriadas con intervalos de 8 meses no variaba significativamente: 31.2% en la primera, al diagnóstico; 24.3% en la segunda y 27.8% en la tercera (efectuado sólo en las pacientes con médula “positiva” en la segunda determinación). Aunque un tercio de las pacientes experimentaban cambios en el estatus medular a lo largo del seguimiento, no se encontró relación de este hecho con el riesgo de recaída o muerte, a diferencia de Braun y cols⁸⁰ para quienes la presencia de células tumorales en otros momentos del seguimiento tiene aún más importancia para el pronóstico que la determinación inicial.

Está demostrado que el número de localizaciones de punción aumenta el rendimiento de la técnica. Algunos autores describen haber realizado extracciones de hasta 8 puntos diferentes⁴⁶, y las normas recientemente establecidas por la ISHAGE aconsejan al menos cuatro localizaciones de extracción⁷². Lógicamente esto sólo es factible cuando las extracciones se realizan en quirófano, antes o después de la intervención quirúrgica sobre la mama, bajo anestesia general, por lo que este criterio no es útil como referencia para la práctica habitual. La mayoría de los trabajos publicados últimamente seleccionan dos puntos de extracción (ambas crestas ilíacas), lo que permite identificar a más del 90% de las pacientes positivas⁵⁶. El estudio de las diferentes localizaciones de extracción por separado no añade ningún dato de interés⁴⁶.

Se discute, por último, el medio más adecuado para realizar la determinación (médula ósea, ganglios linfáticos o sangre periférica) y el tipo de pacientes que pueden beneficiarse más de su realización. Revisaremos estos aspectos en los siguientes apartados.

I.7.2 Lugar de determinación

Se han utilizado métodos inmunocitoquímicos para identificar células tumorales aisladas de diferentes tumores en médula ósea, sangre periférica y ganglios linfáticos.

a) Células tumorales ocultas en médula ósea (tabla 2)

Las revisiones de Pantel⁴⁷, Jauch⁴⁸ y Moss⁵⁵ recogen trabajos que describen la presencia de células tumorales aisladas en la médula ósea de un amplio porcentaje de pacientes diagnosticados de diferentes neoplasias, ya sea en estadio localizado (17-54% de los pacientes) o diseminado (hasta un 70% de los pacientes), tanto en aquellas que frecuentemente metastatizan en el hueso - cáncer de mama, próstata, vejiga, riñón, etc- como en las que no dan metástasis óseas con frecuencia: ovario, colon, estómago, cabeza y cuello, etc. En concreto, en pacientes con cáncer de mama, se detectan células tumorales en médula ósea en un 17-48% de pacientes con ganglios negativos, 30-50% de pacientes con enfermedad axilar y la mayoría de las pacientes con enfermedad avanzada. En el caso de las neoplasias urológicas, aproximadamente un 30% de los pacientes tienen micrometástasis en el momento de la cirugía inicial. La incidencia en pacientes con neuroblastoma, cáncer de colon y pulmón es similar, y mayor aún en otros cánceres digestivos como los de esófago y estómago (hasta un 45% de los pacientes).

El metaanálisis citado de Funke y Schraut⁷¹ recoge los resultados de 20 estudios, sobre un total de 2494 pacientes con cáncer de mama (11 estudios), colon y recto (2), estómago (2), pulmón (2), esófago, páncreas y tumores de cabeza y cuello. La prevalencia mediana de células tumorales ocultas en médula ósea es de 35% en cáncer de mama y 38% en el resto. Los veinte estudios difieren en el número de pacientes incluidos, número de células de médula ósea estudiadas (entre 100.000 y 5.000.000), anticuerpo seleccionado (20 anticuerpos diferentes, aunque los más frecuentes son los dirigidos contra el antígeno epitelial de membrana y frente a citoqueratinas citoplasmáticas), procedimiento de tinción y grupo control utilizado, todo lo cual conduce a resultados muy dispares entre los distintos grupos. Las autoras recomiendan encarecidamente la realización de estudios con técnicas más homogéneas.

TABLA 2.- Estudios inmunocitoquímicos de detección de células tumorales ocultas en médula ósea (Modificada de Pantel et al, J Natl Cancer Inst 1999)⁴⁹

| Tipo de tumor | Marcador | Nº de pacientes (estadio) | % de células (+) | Referencia |
|--------------------|----------|---------------------------|------------------|-------------------------|
| Cáncer de mama | EMA, CK | 100 (I-III) | 38% | Harbeck ⁸¹ |
| | TAG | 727 (I-III) | 43% | Diel ⁸² |
| | Cóctel | 109 (I-II) | 31% | Molino ⁷⁹ |
| | EMA | 350 (I-III) | 25% | Mansi ⁸³ |
| | CK | 552 (I-III) | 36% | Braun ⁷³ |
| | CK | 65 (IV) | 16/73% | Jannu ⁸⁴ |
| | CK | 44 (IV) | 16% | Fetsch ⁸⁵ |
| Cáncer de colon | CK 18 | 88 | 32% | Lindemann ⁸⁶ |
| Cáncer gástrico | CK 18 | 180 | 53% | Jauch ⁸⁷ |
| Cáncer de esófago | CK | 90 | 40% | Thorban ⁸⁸ |
| Cáncer de pulmón | CK | 43 (operable) | 40% | Cote ⁸⁹ |
| | CK 18 | 139 | 60% | Pantel ⁹⁰ |
| Cáncer de ovario | CK | 108 (I-III) | 30% | Braun ⁹¹ |
| Cáncer de páncreas | CK | 49 | 48.9% | Roder ⁹² |

* EMA: antígeno epitelial de membrana; CK: citoqueratina; TAG 12: glicoproteína asociada a tumor

b) Micrometástasis ocultas en ganglios linfáticos:

Igual que la médula ósea, los ganglios linfáticos son otro lugar de diseminación tumoral oculta a los métodos convencionales, que pueden no detectar la afectación en un porcentaje importante de casos, como han señalado prácticamente todos los estudios realizados. Sin embargo no se han puesto de acuerdo en atribuir importancia pronóstica a este hallazgo, porque el número insuficiente de pacientes limita el poder estadístico de los trabajos. Para establecer el valor pronóstico en el caso del cáncer de mama, varios investigadores americanos y europeos⁹³ realizaron un estudio multicéntrico que demostró el incremento en la detección de células tumorales con el análisis inmunohistoquímico ganglionar frente al convencional, así como el peor pronóstico de las pacientes con micrometástasis ganglionares que aquellas en las que no se demuestra afectación adenopática micrometastásica. Estudiaron mediante anticuerpos frente a citoqueratinas los ganglios axilares de 736 pacientes consideradas N₀ tras el estudio histológico rutinario. Detectaron metástasis ocultas en un 20% de las pacientes, con una mayor tasa de detección en las pacientes con tumores de mayor tamaño (26% en los >2cm frente a 16% en los <2 cm). Llamativamente, 40% de las pacientes con carcinoma lobulillar invasivo o mixto lobulillar y ductal , y 15% de las que tenían

carcinoma microinvasivo presentaron células tumorales ocultas. La presencia de metástasis ocultas resultó ser un factor pronóstico independiente fuertemente significativo para la supervivencia global y libre de enfermedad sólo en pacientes postmenopáusicas.

Algunos autores como Diel y Cote⁹⁴ sostienen que la presencia de células ocultas en médula ósea predice el curso de la enfermedad mejor que el estatus ganglionar axilar, y que por tanto esta técnica puede reemplazar a la disección axilar, al menos en pacientes con tumores pequeños y sin signos clínicos de afectación ganglionar. Aun así se tiende más bien a combinar ambas técnicas, ampliando el análisis inmunohistoquímico a los ganglios axilares. Relihan y cols⁹⁵ publicaron que el estudio habitual del ganglio centinela unido a la búsqueda de micrometástasis en médula ósea mejora la estadificación del cáncer de mama. Recientemente dos grupos de investigadores alemanes (Gerber y cols⁹⁶, y Braun y cols⁹⁷) han comunicado los resultados de sus trabajos, en los que la detección de células ocultas en médula ósea se combina con el estudio inmunohistoquímico de ganglios axilares en pacientes con ganglios negativos por técnica convencional. Ambos grupos encuentran células tumorales ocultas en un porcentaje de adenopatías consideradas negativas (6 y 11% respectivamente). Pantel y Cote⁴⁹ concluyen que la inmunohistoquímica puede cambiar el estatus ganglionar de negativo a positivo en un 5 a 20% de las muestras analizadas, y el estudio del ganglio centinela mediante esta técnica reduce los falsos negativos prácticamente a cero. Esto abre un campo interesante de investigación, que no ha prosperado mucho por el momento al ser mínimas las diferencias que se observan en la tasa de recaídas entre las pacientes positivas y negativas, lo que obliga a trabajar con poblaciones muy numerosas para llegar a conclusiones válidas.

c) Células tumorales circulantes en sangre periférica:

La sangre periférica se ha analizado sobre todo en aféresis de pacientes sometidas a quimioterapia a dosis altas y trasplante autólogo de sangre periférica (TASPE), comparativamente con médula ósea obtenida en el harvest. Pecora y cols.⁹⁸ detectan contaminación de aféresis de sangre periférica en 3-22% de pacientes con estadio IV de cáncer de mama, frente a 36-82% en la médula ósea de las mismas pacientes. La misma diferencia se aprecia en pacientes en estadios II y III (4-16% de positividad en sangre periférica versus 36-55% en médula ósea). Claramente se percibe que la sangre periférica tiene menor riesgo de

contaminación que la médula ósea, si bien el mayor número de aféresis parece aumentar la probabilidad de contaminación⁹⁹. Es preciso en cualquier caso ser cautelosos, puesto que algún grupo¹⁰⁰ ha detectado células citoqueratina-positivas en aféresis de donantes sanos, sin que se conozca su significado, que en principio no parece patológico. Otros grupos que han investigado la presencia de células ocultas en sangre periférica no han conseguido detectarlas más que en porcentaje mínimo, incluso aunque se hayan identificado en la médula ósea de los mismos pacientes⁹⁹.

Por tanto la sangre periférica, a pesar de su facilidad de obtención, no parece un medio óptimo para la detección de enfermedad residual. Los nuevos procedimientos de enriquecimiento e inmunoselección celular pueden cambiar este criterio en el futuro⁵⁷, pero por ahora la médula ósea es el lugar más investigado para la identificación de enfermedad subclínica diseminada, por su relativa accesibilidad y su demostrada condición de reservorio de células tumorales ocultas. Concretamente el espacio medular de las crestas ilíacas es un lugar de intercambio intensivo de células entre la sangre y el intersticio mesenquimal⁴⁹, lo cual explica que se hayan detectado células tumorales ocultas procedentes incluso de tumores que generalmente no metastatizan en hueso, como el cáncer de colon.

1.8. Detección de células tumorales ocultas mediante inmunocitoquímica en médula ósea de pacientes con cáncer de mama

En los últimos diez años se han llevado a cabo, como hemos visto, multitud de estudios que investigan la presencia de células tumorales ocultas en médula ósea de pacientes con cáncer. La presencia de micrometástasis ha sido más extensamente estudiada en el cáncer de mama, donde las metástasis óseas constituyen el lugar más frecuente de recidiva. Revisaremos los estudios más relevantes, tanto en pacientes con tumor localizado como en estadios avanzados.

1.8.1. Cáncer de mama localizado

Harbeck y cols⁸¹ examinaron aspirados de médula ósea de 100 pacientes con cáncer de mama no metastásico, obtenidos por punción en seis localizaciones diferentes inmediatamente después de la cirugía. La técnica de determinación combinó dos anticuerpos monoclonales anti-citoqueratina y anti-EMA, que permitieron detectar células tumorales aisladas en 38 pacientes (38%), sin

relación estadísticamente significativa con otros factores pronósticos establecidos. Casi un 50% de las pacientes sin afectación ganglionar axilar presentaba células ocultas en médula ósea.

Diel y cols⁸² estudiaron inmunocitoquímicamente con anticuerpos frente a la mucina TAG 12, aspirados de médula ósea de 727 pacientes con cáncer de mama obtenidos antes de la cirugía mediante punción de dos localizaciones diferentes. Encontraron células tumorales aisladas en 55% de 367 pacientes con cáncer de mama y ganglios axilares afectados, y en 31% de 360 pacientes sin afectación axilar. La presencia de células en MO se relacionó con el mayor tamaño tumoral, la afectación ganglionar y la menor diferenciación histológica.

Molino y cols⁷⁹ objetivaron un 31% de positividad en aspirados de médula ósea de 109 pacientes con cáncer de mama estadios I y II, extraídos 2-4 semanas después de la cirugía y estudiados mediante un pool de anticuerpos monoclonales frente a diversos antígenos de células epiteliales. No encontraron asociación estadística con otros factores pronósticos.

El grupo inglés de Mansi y cols⁸³ publicó en 1999 el estudio con seguimiento más largo hasta el momento (152 meses), que incluyó una población de 350 pacientes con cáncer de mama no metastásico, en el momento del diagnóstico, de las cuales sólo 14% tenían más de 4 ganglios afectados y sólo 27% eran T3 o T4. Tras la cirugía, 141 pacientes recibieron tratamiento adyuvante, 95 con hormonoterapia, y 35 con quimioterapia, mayoritariamente sin antraciclinas. La extracción de la médula se realizó inmediatamente antes de la cirugía, en varios puntos de punción, y emplearon un anticuerpo monoclonal anti-EMA para caracterizar las células. La frecuencia de positividad en MO fue 25% (89 pacientes), menor que en otros estudios similares. Encontraron asociación estadística con el tamaño tumoral (19% de pacientes T0-2 y 40% de pacientes T3-4 tienen médula ósea positiva), ganglios afectados (médula positiva en 19% de las pacientes N₀ y 33% de pacientes N₊) e invasión vascular, pero no con los receptores hormonales ni el estado menopáusico.

El grupo de Braun y cols⁷³, que mantiene desde hace años una productiva e interesante línea de investigación sobre detección y caracterización de células micrometastásicas en diferentes tumores sólidos, estudió la médula ósea de 552 pacientes con cáncer de mama en estadios I, II y III, obtenida mediante aspirado de ambas crestas ilíacas posteriores, así como un grupo control de 191 pacientes

con patología mamaria benigna. De las 251 pacientes con afectación ganglionar, 72 eran postmenopáusicas o con positividad para receptores de estrógenos y progesterona, y recibieron hormonoterapia adyuvante, mientras que las restantes 179 recibieron quimioterapia. A 56 pacientes sin afectación ganglionar se les prescribió hormonoterapia adyuvante mientras que las otras 245 no recibieron ningún tratamiento adicional. La técnica inmunocitoquímica de detección, con anticuerpo A45-B/B3 ha sido descrita en varias ocasiones y validada suficientemente por los mismos investigadores⁷⁰.

Este grupo encontró células tumorales ocultas en un 36% de las pacientes con cáncer de mama no metastásico, incluyendo 33% de las pacientes con ganglios negativos y 22% del grupo con factores teóricamente “mejores”: No, grado 1 ó 2, tamaño menor de 1cm, receptores hormonales positivos. El número mediano de células inmunocitoquímicamente positivas fue bajo, 3 por cada 2 millones de células hematopoyéticas. La exclusión de las muestras con menos células que el número mediano no cambió los resultados estadísticos. En relación con otros factores pronósticos, se detectó asociación estadística con el número de ganglios afectados, el tamaño tumoral y el grado histológico.

1.8.2. Pacientes con cáncer de mama metastásico

Los estudios son más escasos en pacientes con estadios avanzados, en los que la enfermedad diseminada es visible por otros métodos.

Janni y cols⁸⁴ analizaron inmunocitoquímicamente aspirados medulares de 65 pacientes con cáncer de mama en recaída. Describen la presencia de células micrometastásicas en un 16% de las pacientes con recidiva local y en un 73% de pacientes con recaída a distancia.

Fetsch y cols⁸⁵ estudiaron la médula ósea de 44 pacientes con cáncer de mama incluidas en varios ensayos clínicos del National Cancer Institute, mediante citomorfología e inmunocitoquímica, y encuentran positividad medular en 7 pacientes (16%), todas ellas con enfermedad en estadio IV. La tasa de detección fue muy baja comparada con otros estudios, lo cual puede explicarse por el número escaso de pacientes y la irregularidad de técnica empleada, todo lo cual impide extraer conclusiones útiles.

Engel y cols¹⁰¹ han publicado los resultados de su interesante trabajo sobre células tumorales circulantes en pacientes con cáncer de mama y ovario, 23 de

ellas con enfermedad metastásica. Las muestras no proceden de la médula ósea, sino de sangre periférica enriquecida mediante esferas inmunomagnéticas, y la técnica no es inmunocitoquímica sino una combinación de fluorescencia-hibridación in situ (FISH), pero el trabajo sirve para ilustrar cómo las células circulantes en pacientes metastásicas reflejan perfectamente la agresividad tumoral, al presentar un porcentaje significativamente mayor de aberraciones cromosómicas que las células circulantes procedentes de tumores localizados. Por tanto el comportamiento de estas células puede predecir de forma fidedigna la evolución tumoral. El interés teórico de la presencia de células tumorales en médula ósea en pacientes con metástasis es evidente, como factor pronóstico de respuesta a quimioterapia y de supervivencia, y por la información que se puede obtener acerca del comportamiento tumoral en una paciente concreta.

En resumen, utilizando anticuerpos monoclonales frente a antígenos de membrana o citoplasmáticos en preparaciones de células mononucleadas aisladas de aspirados de MO se puede encontrar células tumorales ocultas en un 25-60% de pacientes con cáncer de mama no metastásico o en recaída local, y hasta en un 70% de pacientes con cáncer de mama diseminado. Es interesante destacar que la tasa de detección es muy similar en pacientes con cáncer de mama y con otros cánceres que metastatizan infrecuentemente en hueso. Sin embargo, en estadios avanzados (M1) las células tumorales ocultas en médula ósea se observan más frecuentemente en el cáncer de mama que en el de colon, lo que podría indicar que las células de cáncer de mama encuentran mejores condiciones de crecimiento y supervivencia en el ambiente de la MO que las células de cáncer colorrectal⁵⁵.

1.9. Implicaciones clínicas de la detección de células tumorales ocultas en médula ósea de pacientes con cáncer de mama

1.9.1. Asociación con factores pronósticos

a) Clásicos

La correlación de la presencia de células tumorales ocultas en médula ósea con los factores pronósticos ya establecidos, en el momento del diagnóstico, ha sido una cuestión planteada frecuentemente en los distintos estudios publicados. Los datos son controvertidos. Como muestra la tabla 3, hay autores que detectan asociación entre la presencia de células tumorales en médula ósea y factores como estadio más avanzados, mayor tamaño tumoral, mayor afectación

ganglionar y grado histológico más elevado, mientras que otros no encuentran ninguna relación. Diel y cols⁸², detectan una correlación significativa entre la positividad medular y el tamaño tumoral, la afectación ganglionar y el grado histológico tumoral. El grupo de Mansi y cols⁸³ describe que la presencia de células positivas para EMA (antígeno epitelial de membrana) se asocia significativamente al tamaño tumoral, a la afectación ganglionar y a la infiltración microscópica vascular. Fox y cols¹⁰² comunican asociación con la angiogénesis y con la expresión de receptores hormonales. Braun y cols⁷³ confirman estas observaciones en su estudio con 552 pacientes diagnosticadas de cáncer de mama estadios I, II y III. Sin embargo Harbeck y cols⁸¹, y Molino y cols⁷⁹ no detectan asociación con ningún factor pronóstico establecido.

En el caso de pacientes en recaída, Janni y cols⁸⁵ encontraron correlación estadísticamente significativa con el lugar de recidiva (local versus sistémica, y ósea versus visceral), pero no con el número de localizaciones de metástasis.

b) Nuevos factores pronósticos

Son escasos o no existen los estudios que relacionan la presencia de células tumorales ocultas en médula ósea y nuevos marcadores de proliferación, invasión y metástasis como la fracción S, catepsinas y otras enzimas proteolíticas. Braun y cols¹⁰³ han comunicado un peor pronóstico en las pacientes con células tumorales ocultas en médula ósea que sobreexpresan el receptor p185^{erbB2}, codificado por el oncogén erbB2: de 52 pacientes estudiadas, tras un seguimiento mediano de 64 meses, han recaído 21 de las 31 pacientes con células citoqueratina y p185^{erbB2} positivas y 7 de las 19 pacientes citoqueratina (+) p185^{erbB2} (-). Se ha detectado además correlación significativa con la invasión vascular⁸³ y con el desarrollo de nueva vascularización (angiogénesis), factor fundamental para el crecimiento y diseminación tumoral. Fox¹⁰² y Mac Donnell¹⁰⁴ han resaltado la importancia de este hallazgo por sus implicaciones terapéuticas, entre las que se cuenta el potencial beneficio de los fármacos antiangiogénicos frente a la enfermedad mínima residual detectada en médula ósea.

TABLA 3.- Relación de las células tumorales ocultas con factores pronósticos en el cáncer de mama

| Autores | Factor significativamente asociado |
|------------------------------|--|
| Harbeck ⁸¹ , 1994 | No correlación |
| Diel ⁸² , 1996 | Tamaño tumoral, afectación ganglionar, grado histológico |
| Molino ⁷⁹ , 1997 | No correlación |
| Mansi ⁸³ , 1999 | Tamaño tumoral, afectación ganglionar, invasión vascular. |
| Braun ⁷³ , 2000 | Tamaño tumoral, afectación ganglionar, grado histológico |
| Fox ¹⁰² | Angiogénesis tumoral, grado histológico, receptores estrogénicos |
| Janni ⁸⁴ , 2000 | Pacientes metastásicas: recaída osea |

I.9.2. Valor pronóstico

A pesar de la discordancia de resultados, parece cada vez más claro que la detección de células tumorales ocultas en médula ósea de pacientes con cáncer se relaciona con un peor pronóstico. Ni siquiera los investigadores que no detectan asociación estadística con la supervivencia o las recaídas niegan el valor pronóstico de la enfermedad micrometastásica; únicamente recomiendan más estudios, y una interpretación y aplicación clínica cautelosa de los resultados. El metaanálisis de Funke y Schraut ya descrito⁷¹ no encuentra en conjunto relación entre la enfermedad micrometastásica medular y la supervivencia global o libre de recidiva en los estudios univariados ni multivariados. Sin embargo los estudios que incluyen mayor número de pacientes y con seguimiento más largo muestran que la presencia de células tumorales en médula ósea en el momento del diagnóstico es un factor fuertemente anunciador de recaída, y en tres de ellos^{73, 81, 82} es un factor independiente en el análisis multivariado que incluye los factores pronósticos clásicos. En los trabajos anteriormente reseñados los resultados son, en general, concordantes, excepto para Molino y cols⁷⁹, que no encuentran relación entre este parámetro y el número de recaídas ni la supervivencia en el análisis estadístico (Tabla 4):

Harbeck y cols⁸¹, tras un seguimiento mediano de 34 meses, objetivaron recaída en un 39% de las pacientes con MO positiva, frente a un 15% de las pacientes con MO negativa. Esta diferencia resultó estadísticamente significativa, y el análisis multivariado mostró que la presencia de células en MO es un factor de mal pronóstico fuertemente significativo, tanto para la recaída como para la supervivencia global.

Diel y cols⁸² encuentran que la médula ósea positiva es un factor de mal pronóstico independiente tanto para la recaída como para la reducción en

supervivencia global, especialmente en el grupo de pacientes con tamaño tumoral inferior a 2 cm.

Mansi y cols⁸³ objetivan 189/350 (54%) recaídas a los 10 años, la mayoría en los primeros 5 años. Un 66% de las pacientes con médula afecta recayó y un 53% falleció por enfermedad, frente a un 40 y 34% respectivamente de las pacientes sin afectación medular. Dentro del grupo de ganglios negativos, 50% de las pacientes $N_0MO_{(+)}$ recayeron frente a 36% de las pacientes $N_0MO_{(-)}$. La conclusión es que la presencia de células tumorales en médula ósea se asocia con menor supervivencia global y libre de recaídas, pero no es un factor pronóstico independiente.

Braun y cols⁷³ describen una supervivencia global (4 años de seguimiento) significativamente mayor en las pacientes sin médula afecta (93%), frente a un 68% de las que muestran médula ósea positiva. Es interesante resaltar que estas pacientes presentaron mayor frecuencia de recaída sistémica, especialmente ósea, mientras que las recaídas locales fueron similares en los dos grupos. También tiene gran interés el análisis de supervivencia que realizan estos investigadores uniendo el factor pronóstico afectación ganglionar con la afectación micrometastásica medular. Diferencian tres grupos de riesgo: el grupo de mejor pronóstico es el de “ganglios negativos-médula negativa”, con supervivencia a dos años casi del 100%, y el de peor pronóstico es el de “ganglios positivos-médula positiva”, con un riesgo relativo de mortalidad por cáncer de 13,26 frente al grupo anterior, y una probabilidad de supervivencia a dos años menor del 50%. El grupo intermedio incluye a las pacientes con “afectación ganglionar y médula negativa” y a las pacientes “sin afectación ganglionar con médula positiva”, con un 80% de probabilidad de supervivencia a dos años. El interés clínico de esta clasificación es evidente al separar pacientes de distinto riesgo dentro de la clásica diferenciación por afectación ganglionar, lo cual puede permitir ajustar más la agresividad del tratamiento al riesgo de recaída de la paciente (Fig. 6).

En el grupo de pacientes metastásicas descrito por Janni y cols⁸⁴, este hallazgo no tiene valor pronóstico en las pacientes con recaída locorregional, pero establecen un punto de corte de 2.5×10^6 células por millón a partir del cual la mediana de supervivencia es significativamente menor en las pacientes con recaída a distancia (17 meses en las pacientes con $<2.5 \times 10^6$ células frente a 4.4 meses en las que tienen más de 2.5×10^6 , con $p < 0.0001$). La conclusión es que la

presencia de células tumorales en médula ósea de pacientes con cáncer de mama metastásico representa un factor pronóstico independiente para la supervivencia global. El estudio de Fetsch y cols⁸⁵ no tiene un número de pacientes suficiente para extraer conclusiones, aunque los autores describen una evolución clínica peor en las pacientes con médula positiva

TABLA 4.-. Valor pronóstico de la detección de las células tumorales ocultas en MO en el cáncer de mama

| Autores | Asociación significativa | Factor independiente |
|-----------------------------|------------------------------------|----------------------|
| Harbeck et al ⁸¹ | SG | Si |
| | SLE | Si |
| Diel et al ⁸² | SG | Si |
| | SLE | Si |
| Molino et al ⁷⁹ | No valor pronóstico para SG ni SLE | No |
| Mansi et al ⁸³ | SG | No |
| | SLE | No |
| Braun et al ⁷³ | SG | Si |
| | SLE (sistémica, ósea) | Si |
| Janni et al ⁸⁴ | SG (estadio IV) | Si |

* SG: Supervivencia global. SLE: Supervivencia libre de recidiva

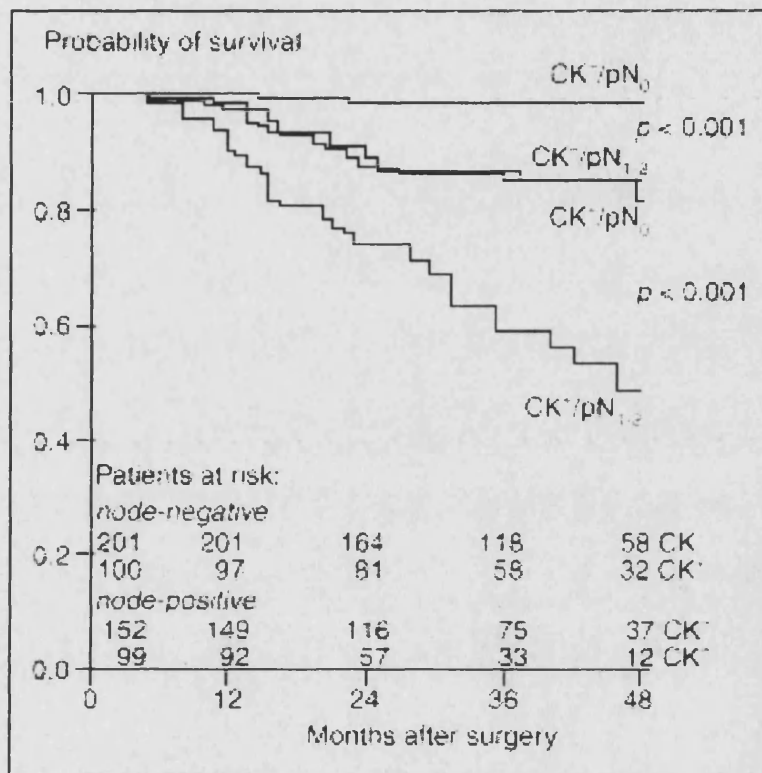


FIG. 6.- Gráfico de supervivencia global para las pacientes con micrometástasis detectadas inmunocitoquímicamente en médula ósea, estratificadas según la afectación ganglionar. El grupo de pacientes con micrometástasis y ganglios negativos tiene una evolución similar al de pacientes con ganglios afectados pero médula ósea negativa. (Braun et al. N Eng J Med 2000; 342: 525-533)⁷³

Se discute si las células tumorales detectadas en médula ósea son realmente micrometástasis, con capacidad de crecimiento y diseminación a distancia, o simplemente células circulantes liberadas por el tumor, sin potencial proliferativo, en cuyo caso no deberían ser consideradas como enfermedad mínima residual. El único método para demostrarlo es el cultivo celular y posterior implantación en ratones atímicos, técnica que no puede utilizarse rutinariamente, por lo que deben buscarse procedimientos indirectos. Varios grupos han estudiado características biológicas de estas células como la expresión de indicadores de proliferación (Ki-67, p120, que aparecen en todas las fases del ciclo celular excepto G₀) mediante técnicas de doble marcaje observando una capacidad proliferativa reducida^{70, 105}. Esto ha llevado a pensar que la mayor parte de las células están fuera de ciclo, en fase G₀, “durmientes”. Se supone que pueden permanecer así años y pasar a fase proliferativa en algún momento de la evolución, sin que por ahora se conozcan marcadores capaces de detectar la activación, aunque ya se ha comentado la observación del mismo grupo de investigadores¹⁰³ acerca de una peor evolución en las pacientes con células tumorales ocultas en médula ósea que sobreexpresan el receptor p185^{erbB2}

Recientemente Tórtola y cols¹⁰⁶ han cuestionado el carácter maligno de las células tumorales ocultas en la médula ósea de pacientes con cáncer de colon, al detectar diferente clonalidad para las mutaciones del K-ras entre el tumor primario y las células ocultas. La condición neoplásica de estas células es clara, sin embargo, tanto por su expresión fenotípica, que incluye un conjunto heterogéneo de marcadores asociados a tumores (heterogeneidad que refleja la conocida inestabilidad genómica de las células neoplásicas), como por las aberraciones cromosómicas detectadas en los análisis genómicos mediante FISH^{101, 107}. La figura 7 muestra la variedad y frecuencia de expresión de distintos marcadores por parte de las células tumorales ocultas en médula ósea.

Consecuentemente autores como Pantel^{70,105} y Hermanek^{108, 109} recomiendan reservar el término de micrometástasis para las agrupaciones celulares microscópicas (menores de 3mm) con características funcionales de proliferación como la neoangiogénesis verificable, reservando el término de células tumorales aisladas, ocultas o circulantes para estas otras que se identifican en tan escaso número, si bien reconocen que la presencia de estas células indica un mayor riesgo de metástasis y por tanto un pronóstico desfavorable.

número, si bien reconocen que la presencia de estas células indica un mayor riesgo de metástasis y por tanto un pronóstico desfavorable.

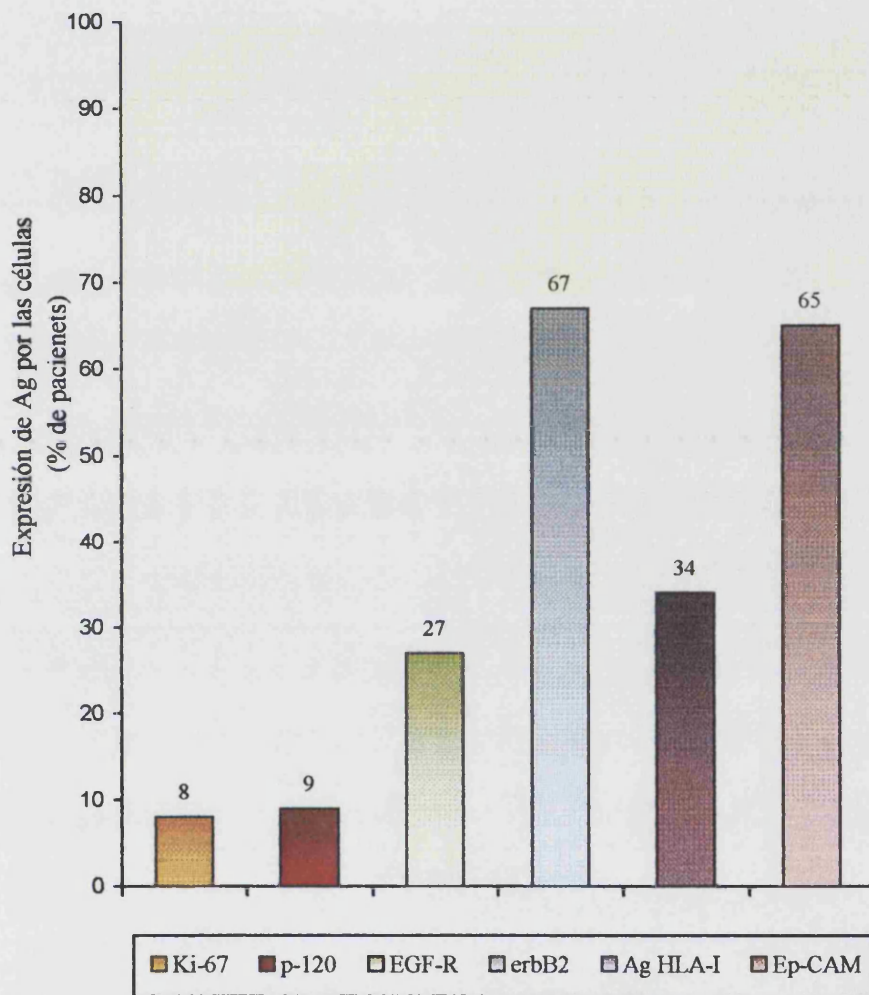


FIG. 7.- Fenotipo de las células tumorales ocultas en MO: el rótulo indica porcentaje de pacientes que expresan cada marcador (Modificado de Pantel K, von Knebel M Curr Opin Oncol 2000)⁴⁷

I.9.3. Implicaciones terapéuticas

La aplicación terapéutica de los conocimientos que se van adquiriendo acerca de la enfermedad residual en médula ósea es por ahora una perspectiva más que una realidad. Los interrogantes sobre su utilidad en diferentes circunstancias son constantes y estimulan la realización de estudios que en algunas situaciones son ya numerosos mientras que en otros no pasan de meros apuntes. Se investiga su empleo en el trasplante de célula germinal de sangre periférica en tumores sólidos, en el tratamiento adyuvante para evaluar la quimiosensibilidad tumoral, en la selección y monitorización de nuevas modalidades terapéuticas o en la identificación de pacientes con elevado riesgo de metástasis óseas. Se ha sugerido el potencial interés de la determinación en contextos clínicos como la enfermedad metastásica o en las pacientes con muy probable recaída como son aquellas sin enfermedad evidente en las que se elevan los marcadores tumorales séricos durante el seguimiento¹¹⁰.

a) Aplicación en el autotrasplante de sangre periférica

El tratamiento con altas dosis de quimioterapia y soporte hematopoyético con células germinales de médula ósea o sangre periférica ha sido ampliamente utilizado para tratar pacientes con cáncer de mama, con base en estudios fase II que sugerían beneficio clínico en algunos grupos de pacientes con enfermedad metastásica o de alto riesgo de recaída¹¹¹. Sin embargo los resultados preliminares de la mayoría de los estudios fase III sugieren un escaso o nulo beneficio del tratamiento con quimioterapia a dosis altas^{112, 113}. En espera de los resultados definitivos de los ensayos clínicos que continúan activos, la identificación de factores pronósticos asociados a un mayor riesgo de recaída postrasplante puede ayudar a definir mejor qué pacientes pueden beneficiarse de esta aproximación terapéutica. En estas pacientes uno de los teóricos mecanismos de recaída que se han propuesto es la enfermedad mínima residual en la médula ósea o aféresis de sangre periférica infundidas, mecanismo que ha sido estudiado también en otros tumores sólidos que potencialmente se benefician del tratamiento con quimioterapia intensiva y soporte hematopoyético¹¹⁴.

Como en las otras situaciones, los resultados obtenidos en los distintos estudios han sido contradictorios. Muchos investigadores han documentado la presencia de células tumorales ocultas en los productos de aféresis o médula ósea

de pacientes con médula histológicamente normal^{100, 115}, pero hasta el momento ningún estudio ha demostrado que la infusión de “stem cells” contaminadas con células tumorales sea responsable de las recaídas postrasplante, ni está claro si las recidivas son causadas por persistencia de enfermedad sistémica, infusión de células tumorales con capacidad clonogénica, o una combinación de ambos factores. Algunos grupos no han encontrado ninguna relación entre la presencia de células tumorales ocultas en los productos de aféresis y la evolución clínica^{116, 117}. Sin embargo hay varios trabajos que relacionan la presencia de células contaminantes con la obtención de peores resultados postrasplante^{60, 118}, hipótesis que nuestro grupo ha podido comprobar en 51 pacientes con cáncer de mama de alto riesgo de recaída tratadas en el Hospital Clínico de Valencia, de las cuales 77% de las que habían recibido aféresis positiva (contaminada) recayeron, frente a 25% de las que recibieron aféresis negativa, tras un seguimiento mediano de 52 meses¹¹⁹. Además, en varios tipos de neoplasias se han podido detectar células marcadas, infundidas con el injerto, en localizaciones de metástasis^{120, 121}.

La disparidad metodológica y el escaso número de pacientes, con situaciones clínicas muy diversas, obliga a considerar los resultados con cautela. Se ha preconizado la evaluación de la médula ósea de todas las pacientes candidatas a trasplante en busca de células tumorales ocultas, y el purgado de los productos de aféresis para eliminar la contaminación¹¹⁴, pero por ahora no deja de ser una aproximación experimental. Hace falta realizar estudios bien diseñados con adecuado número de pacientes que permitan un análisis multivariado de los datos, sin el cual es difícil determinar si la contaminación del injerto es realmente la causa de la recaída postrasplante o si es un marcador más de agresividad tumoral.

b) Utilidad en el tratamiento adyuvante:

Hace más de 15 años que está bien establecida la eficacia del tratamiento hormonal o quimioterápico adyuvante en el cáncer de mama, ratificada por los Consensos del NIG en 1985 y 1990. Ya se han comentado las conclusiones del metaanálisis del Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group¹⁸ sobre 33 ensayos randomizados con 75000 pacientes, según el cual la reducción en el riesgo de recaída y muerte que aporta el tratamiento sistémico tras la cirugía, aunque modesta, se traduce en un beneficio importante para muchas pacientes. Hasta ahora la indicación de tratamiento viene dada por un cálculo de

probabilidades, según el riesgo de recidiva que señalen los factores de mal pronóstico detectados en el estudio del tumor. Esto hace que en algunas pacientes el tratamiento sea innecesario, y en otras insuficiente, y que no haya otra forma de averiguarlo más que observar la evolución.

En esta situación, se ha postulado que la determinación de células tumorales ocultas podría ser útil en dos sentidos: por una parte, para seleccionar pacientes de riesgo candidatas a tratamiento; por otra, para evaluar la quimiosensibilidad del tumor ⁴⁹.

La mayoría de los autores recomiendan la determinación de células ocultas en médula ósea antes de comenzar un tratamiento, para averiguar el efecto de los diferentes fármacos sobre la eliminación de estas células y la importancia pronóstica de ese efecto, pero por el momento sólo se han publicado dos estudios prospectivos dirigidos a evaluar la acción de la quimioterapia adyuvante sobre las células residuales en médula ósea de pacientes con cáncer de mama. Molino y cols⁷⁹ incluyeron 125 pacientes con cáncer de mama estadio I y II en un estudio diseñado para apreciar la evolución de las células ocultas en médula ósea mediante aspirados repetidos. En 73 pacientes de las que recibieron tratamiento adyuvante, con ciclofosfamida-metotrexate-5FU (57) o tamoxifeno (16), se realizó una segunda determinación. La médula ósea fue positiva en 34% de las pacientes al inicio y en 30% después del tratamiento (Tabla 5), sin diferencias entre las que recibieron quimio u hormonoterapia. Braun y cols⁸⁰ examinaron la médula ósea de 59 pacientes con carcinoma de mama inflamatorio o de alto riesgo de recaída (más de 4 ganglios axilares afectados) antes y después de la quimioterapia neoadyuvante (23/59 pacientes) o adyuvante (36/59 pacientes) con antraciclinas, combinadas o no con taxanos. La frecuencia de positividad fue 49,2% (29/59 pacientes) antes de la QT y 42,4% (26/59) después. Igual que en el estudio de Molino y cols⁷⁹, algunas pacientes con médula ósea inicialmente positiva no presentaban células tumorales en la 2ª determinación, mientras otras con médula previamente negativa mostraban células tumorales tras el tratamiento. Este efecto se observó en los dos grupos de pacientes (Tabla 5). Con una mediana de seguimiento de 19 meses, la frecuencia de recaídas fue mayor en las pacientes con médula ósea positiva después de quimioterapia. La evolución de las pacientes cuya médula se negativizó o positivizó fue igual que la de las que previamente la tenían negativa o positiva, respectivamente. La administración de taxanos no mostró diferente efecto que la de antraciclinas.

Los autores concluyen que los fármacos citotóxicos utilizados actualmente en el tratamiento del cáncer de mama no parecen eliminar las células tumorales ocultas en médula ósea, a pesar de su probada eficacia en otras localizaciones. La explicación apuntada es la posibilidad de que esas células se encuentren en estado latente y no en ciclo celular. Esto debería comprobarse en poblaciones más numerosas y con pacientes en todos los estadios, incluyendo pacientes metastásicas.

TABLA 5.- Efecto de la QT sobre las células ocultas en MO

| Nº Pacientes | Molino y cols ⁷⁹ (n = 73) | Brown y cols ⁸⁰ (n=59) | |
|----------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|--------------|
| | | CM inflamatorio | >=4 ganglios |
| Positivización de MO | 10 | 4 | 7 |
| Negativización | 13 | 6 | 8 |
| Permanece positiva | 12 | 9 | 5 |
| Permanece negativa | 38 | 4 | 20 |

c) Selección de nuevas modalidades terapéuticas

Varios investigadores han sugerido que el estudio de las células tumorales ocultas en médula ósea permite caracterizar fenotípicamente la enfermedad oculta para diseñar tratamientos específicamente dirigidos contra ella^{47, 122}. Está ampliamente reconocida ya la utilidad terapéutica de los anticuerpos monoclonales en neoplasias que expresan determinados antígenos; así, los anticuerpos anti-CD20 (Rituximab) en los linfomas y otras enfermedades linfoproliferativas^{123, 124}, el anticuerpo anti CO17-1 A (Edrecolomab) frente a moléculas de adhesión de las células epiteliales (EpCAM), que ha demostrado actividad en el tratamiento adyuvante del cáncer de colon^{125, 126} y, más recientemente, el anti-HER2/neu (Trastuzumab) frente a carcinomas de mama con sobreexpresión del oncogén erb-2¹²⁷.

Pantel y cols⁷⁰ realizaron un estudio randomizado con el anticuerpo monoclonal ABL 364, diseñado por los mismos autores, dirigido contra el antígeno de membrana Lewis^Y, frente a placebo. Administraron 6 dosis de 100 mg en 2 semanas a pacientes con cáncer de mama avanzado, y constataron una depleción significativa de las células citoqueratina-positivas en médula ósea, sin afectar a las metástasis en otras localizaciones. Este efecto no se apreció en las

pacientes tratadas con placebo ni en las que no presentaban el antígeno estudiado.

Braun y cols¹²⁸ estudiaron la eficacia del anticuerpo monoclonal murino edrecolomab (administrado en una dosis única de 500 mg) sobre células tumorales ocultas en la médula ósea de 10 pacientes con cáncer de mama metastásico. Las células fueron identificadas inmunocitoquímicamente por la coexpresión de citoqueratinas y la molécula epitelial de adhesión EpCAM. Apreciaron eliminación completa de células tumorales (CK y CK/EpCAM+) en 4 pacientes, y sensible reducción en el número de células en todas las demás.

Un inconveniente para esta aproximación terapéutica es la marcada heterogeneidad antigénica de las células tumorales en los tumores sólidos, que explica la eficacia sólo parcial del tratamiento. Braun y col¹²² han comunicado el aumento en el número de células tumorales identificadas mediante inmunocitoquímica cuando se utiliza un “cóctel” de anticuerpos anti erbB2, CO17-1A, MUC1 y Lewis^y además del anticuerpo frente a citoqueratinas, concluyendo que la administración de conjugados de anticuerpos monoclonales, que actúen sobre las diferentes células, mejorará las respuestas.

Otra aproximación interesante es la posibilidad de obtener líneas celulares a partir de las micrometástasis, para la investigación “in vitro” de la acción de diferentes fármacos¹²⁹.

d) Identificación de pacientes con riesgo elevado de metástasis óseas: ya se ha expuesto el alto riesgo de metástasis óseas que aparentemente presentan las pacientes con células citoqueratina-positivas en la médula ósea. En el estudio citado de Harbeck⁸¹, 7 (20%) de las 38 pacientes con médula ósea afecta recayeron en hueso frente a 0 de las 62 pacientes sin afectación medular. De las 552 pacientes incluidas en el estudio de Braun y cols⁷³, 74 (14%) presentaron recaída ósea durante el seguimiento, de las cuales 66 (89%) presentaban células micrometastásicas en MO.

Diel y cols¹³⁰ observaron una menor incidencia de metástasis, óseas y también sistémicas, en un estudio con 302 pacientes diagnosticadas de cáncer de mama localizado, que presentaban células tumorales ocultas en la médula ósea, asignadas aleatoriamente a recibir clodronato oral o a seguir un control clínico estándar. Este es el único estudio que utiliza como criterio de inclusión el factor

“afectación micrometastásica medular”. Otros trabajos evalúan el efecto del tratamiento antiosteolítico adyuvante con bifosfonatos (clodronato o pamidronato oral) en pacientes con riesgo de metástasis óseas, por recaída extraósea o alto riesgo de recidiva en general, con resultados variables. Un estudio randomizado (clodronato oral “versus” nada), realizado por Saarto y cols¹³¹ en 299 pacientes con afectación axilar, no encontró diferencias en la frecuencia de metástasis óseas entre los dos grupos, e incluso detectó mayor número de recaídas sistémicas en el grupo tratado con clodronato, mientras que los responsables de un tercer ensayo randomizado y controlado con placebo que incluye 1079 pacientes han comunicado los resultados de un análisis interino, con evidencia de reducción en la frecuencia de metástasis óseas, sin mostrar efecto alguno sobre las recaídas sistémicas¹³².

e) Tratamiento de la enfermedad metastásica: no hay estudios que evalúen de forma prospectiva el papel de la detección de células tumorales en el tratamiento de pacientes con enfermedad metastásica, pero Janni y cols⁸⁴ apuntan una hipótesis similar a la comentada para el tratamiento adyuvante: aunque haya otras localizaciones que posibiliten la valoración de la enfermedad y de la respuesta mediante técnicas de imagen, el estudio de la médula puede proporcionar una valoración funcional sobre la persistencia de enfermedad residual, la quimiosensibilidad y el fenotipo tumoral para diseñar el tratamiento más adecuado.

f) Enfermedad mínima residual en pacientes con marcadores tumorales elevados:

La utilización de análisis serológicos para el seguimiento del cáncer de mama, como para otros tipos de cáncer, ha sido desde hace años una meta atractiva, que idealmente permitiría abaratar y simplificar las exploraciones y reducir ansiedad en los pacientes. Se ha ido definiendo el concepto de marcadores tumorales¹³³, sustancias producidas o inducidas por la célula neoplásica del tumor primitivo o de sus metástasis, cuantificables en líquidos biológicos o en el tejido tumoral, que reflejan crecimiento o actividad de la neoplasia. Muchas de estas sustancias son detectables en suero, y en algunos tipos de tumores han demostrado una enorme utilidad, como en los tumores germinales, en los que la cantidad de marcador en suero se correlaciona estrechamente con la actividad de la enfermedad y permite monitorizar la respuesta al tratamiento y realizar un seguimiento sencillo y fiable. La tabla 6

muestra los marcadores tumorales más utilizados en diferentes tumores. El problema con la utilización de estas sustancias es la heterogeneidad en el comportamiento de las neoplasias, de modo que en un porcentaje de casos no elevan los marcadores a pesar de una evolución agresiva o de una recaída constatada. Por este motivo los marcadores tumorales séricos son un factor más, y no el único, en el seguimiento de los tumores sólidos, que cuando se elevan ofrecen información de interés acerca de la respuesta al tratamiento y del riesgo de recidiva.

La elevación de marcadores tumorales, confirmada por determinaciones seriadas y no explicada por otra causa, obliga a descartar una recaída tumoral¹³⁴ pero -excepto en los tumores germinales y en la enfermedad trofoblástica gestacional- no se ha demostrado hasta el momento que la elevación de marcadores en un paciente asintomático y sin otra evidencia de enfermedad sea criterio para iniciar un tratamiento que por otra parte no carece de toxicidad¹³⁵. En estas condiciones la utilidad de la determinación periódica de marcadores tumorales no está claramente determinada, e incluso no se ha incluido entre las recomendaciones para el seguimiento que publica periódicamente la American Society of Clinical Oncology, internacionalmente reconocidas^{136, 137}

En el cáncer de mama se han investigado diferentes marcadores séricos, de los cuales el más utilizado inicialmente fue el antígeno carcinoembrionario (CEA), cuyos niveles se elevan en un 40% de las pacientes con cáncer de mama metastásico, y en un porcentaje menor de pacientes con recaída inminente, aun no demostrada¹³⁴. La desventaja de este marcador estriba en una elevada tasa de falsos positivos (hasta 30%) y una baja especificidad. Ultimamente no se recomienda su utilización en el cáncer de mama porque su elevación suele coincidir con enfermedad tumoral voluminosa en otras localizaciones, mientras que su sensibilidad para detectar pacientes con enfermedad mínima es muy baja¹¹⁰.

En los últimos 15 años varios estudios han demostrado que la monitorización de glicoproteínas de elevado peso molecular, tipo mucina, como el CA15-3, CA549 y otros, en el suero de pacientes con cáncer de mama es superior a la de CEA¹³⁴. La elevación de CA15-3 en dos determinaciones seriadas puede predecir la recaída en un 40-60% de pacientes libres de enfermedad. En nuestro grupo, Vizcarra^{138, 139} demostró, en 444 pacientes con cáncer de mama libres de enfermedad después del tratamiento inicial, que CA15-3 es más sensible que

CEA como indicador temprano de recaída, que la predice más precozmente (7.5 meses vs 4.9) y que la determinación simultánea de otros marcadores no ofrece información adicional a la obtenida estudiando sólo CA15-3.

Como ya se ha descrito para los tumores sólidos en general, la situación clínica en la que se elevan los marcadores tumorales en una paciente con cáncer de mama, libre de enfermedad y sin evidencia de recaída, es un problema que por ahora no tiene solución estándar. Los estudios de extensión pueden localizar metástasis en un porcentaje de pacientes, pero un número considerable no presentarán enfermedad demostrable en ese momento. Se especula que los marcadores expresan enfermedad mínima oculta¹¹⁰, pero la posibilidad de que se trate de falsos positivos no permite aplicar tratamiento citostático a estas pacientes hasta que no hay recaída demostrada. Algún investigador⁸⁴ ha sugerido que la detección de enfermedad residual medular en pacientes sin otra evidencia de enfermedad puede proporcionar razones para administrar tratamiento sistémico en un momento en que la enfermedad podría ser incluso ser curable.

No hay estudios que analicen la presencia de células tumorales en médula ósea de las pacientes con marcadores elevados y sin enfermedad constatable, pero está en el aire la pregunta acerca del papel que dichas células ejercen en esta situación clínica.

En resumen: se han desarrollado técnicas con la suficiente sensibilidad y especificidad como para detectar un número mínimo de células tumorales micrometastásicas en médula ósea y, en menor medida en sangre periférica, de pacientes con cáncer de mama. Las investigaciones realizadas han ido contestando una serie de preguntas acerca de la probabilidad de detección de éstas células, de sus características biológicas, del procedimiento más adecuado y del valor pronóstico de este hallazgo. Es mucho lo que se ha dicho sobre la enfermedad residual en médula ósea en pacientes con cáncer de mama, pero quedan muchas cuestiones insuficientemente resueltas, así como clarificar los resultados de los diferentes grupos para sentar las bases de posteriores investigaciones.

TABLA 6: Marcadores tumorales de utilización más frecuente

| MARCADOR | Características | Patología benigna | Tumores | Valor normal |
|----------------------|---|--|--|--------------------------|
| CEA | Glicoproteína 180 kd | Hepática Pancreática Colitis ulcerosa Tuberculosis pulmonar Insuf renal crónica Fumadores | Colorrectal (75%) Gástrico (10-30%) Pulmón Mama Ovario, endometrio Vejiga Hígado y otros | <5 ng/ml |
| CA 15.3 | Mucina compleja 300-450 kd | Mamaria Hepática Pancreática Inf. urinaria | Mama Ovario Pulmón Colorrectal | <30 U/ml |
| CA 12.5 | Glicoproteína 200-10000 kd | Endometriosis Menstruación Embarazo Hepáticas Ascitis, derrames Enf. inflamatoria pélvica | Ovario (seroso, endometrioide) Ca pulmón no microcítico LNH B mediastino Páncreas Gástrico Colorrectal | <35 U/ml |
| CA 19.9 | Oligosacárido 360-1000 kd | Obstrucción biliar Pancreatitis crónica Hepática Gastrointestinal Pulmonar | Páncreas Via biliar Colorrectal Gástrico Ovario mucinoso Utero Mama | <40 U/ml |
| AFP | Glicoproteína Oncofetal 70 kd | Embarazo Hepática | Hepatocarcinoma Ca germinal de ovario o testículo no seminoma | <11 nng/ml |
| Beta-HCG | Hormona 3900 kd | Embarazo | Ca testículo Enfermedad trofoblástica gestacional Pulmón Gástrico | <3 mU/ml |
| EnolasaNE | Enzima | Pulmonar | Ca pulmón oat cell Tumores neuroendocrinos Tumor de Wilms Sarcoma de Ewing | <12.5 ng/ml |
| CYFRA 21.1 | Fragmento de la citoqueratina 19 30 kd | Renal Pulmonar | Ca pulmón Ca del área ORL Vejiga Cérvix | <3.3 ng/ml |
| PSA | Glicoproteína 30 kd | Prostática Biopsia próstata | Cáncer de próstata | <4 (<50 a) <5 (>50 a) |
| SCC | Glicoproteína 48 kd | Hepática Biliar | Ca epidermoides | <2 ng/ml |
| Tiroglobulina | Proteína depósito | Tiroiditis Punción tiroidea | Ca tiroides papilar y folicular | <25 ng/ml |
| Cacitonina | Hormona | Raro: hiperparatiroidismo, enf Paget. | Ca medular de tiroides Tumores cresta neural | <10 pg/ml |

II. HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

El concepto sobre la evolución del cáncer de mama se ha modificado con los años hasta la aceptación actual de esta enfermedad como un proceso sistémico con un curso crónico, cuyo pronóstico viene marcado por la diseminación precoz de células metastásicas por vía hematógena⁴. Como consecuencia de esta concepción, se ha desarrollado la cirugía conservadora y se ha reconocido el papel beneficioso del tratamiento adyuvante sistémico como complemento de tratamiento local¹⁸, con base en su probable acción sobre la enfermedad micrometastásica subclínica. Se han identificado -y la investigación continua abierta- multitud de factores pronósticos¹⁹ capaces de señalar subgrupos de pacientes con mayor riesgo de recaída y muerte, candidatas a tratamientos más intensivos.

Todos estos marcadores son detectables en la pieza inicial, pero no se dispone de ningún factor que permita evaluar, tras la extirpación del tumor macroscópico, el comportamiento de la enfermedad residual en cuanto a la respuesta a quimioterapia y al desarrollo de mecanismos de metastatización. La eficacia de la quimioterapia adyuvante en el cáncer de mama, hasta ahora, sólo ha podido ser evaluada retrospectivamente en ensayos clínicos con gran número de pacientes y largo seguimiento, por lo que el progreso en la investigación de este tipo de tratamiento es extremadamente lento. Por otra parte, es difícil ajustar el tratamiento más adecuado a una paciente individual. De aquí la importancia de disponer de un marcador fiable que permita analizar inmediatamente los efectos citotóxicos inducidos por la quimioterapia.

Se han dedicado esfuerzos importantes a la búsqueda de células malignas en la médula ósea, por ser un órgano de intercambio hemático continuo, posiblemente visitado por las células micrometastásicas en su viaje hacia localizaciones secundarias, y fácilmente accesible para la obtención de muestras⁴⁹. Pero las técnicas convencionales de estudio de la médula ósea no han conseguido detectar dichas células de forma satisfactoria ni han aportado información de especial interés. Desde la década de los 80, en que Sloane y cols⁵⁰ detectaron inmunocitoquímicamente células neoplásicas en médula ósea de pacientes con cáncer de mama y otros tipos de tumores epiteliales, se dispone de diversos anticuerpos monoclonales que permiten hacer visibles pequeñas cantidades de células epiteliales en un medio mesenquimal, y por tanto realizar estudios detallados de estas células en médula ósea.

Se ha visto que es frecuente detectar células tumorales ocultas en la médula ósea de pacientes con cáncer de mama, tanto en el momento del diagnóstico inicial^{73, 79, 81, 82, 83}, como en la recaída⁸⁴ y probablemente en otros momentos evolutivos⁷⁹. Su función en el proceso de diseminación tumoral no está claramente establecida: se discute si estas células tienen capacidad clonogénica o si se trata de células quiescentes, dormidas, sin potencial metastatizante, que desaparecerán tan silenciosamente como viven¹⁰⁸. Varios grupos han encontrado un efecto claramente negativo de la presencia de células tumorales ocultas en médula ósea en la evolución de pacientes con cáncer de mama^{73, 81, 82}, si bien no todos coinciden en que se trate de un factor independiente⁸³. En cualquier caso, se postula que al menos estas células son un reflejo del comportamiento tumoral.

II.1. HIPOTESIS DE TRABAJO

Este trabajo intenta fundamentar la hipótesis de que las células ocultas en médula ósea expresan enfermedad neoplásica, residual en pacientes por otra parte libres de enfermedad, o “paralela” a la enfermedad extramedular en pacientes metastásicas, cuyo comportamiento refleja el de la enfermedad tumoral. Se trata de encontrar un marcador de la enfermedad que aporte información dinámica sobre su evolución y sensibilidad al tratamiento, en una fase precoz.

Como primer paso de esta investigación, se intenta averiguar el comportamiento de las células tumorales en médula ósea en pacientes con cáncer de mama en diferentes situaciones clínicas, tras la administración de quimioterapia. Si las células tumorales ocultas son realmente células neoplásicas residuales, la administración de quimioterapia sistémica debería actuar sobre esta “microdiseminación”, eliminando las células tumorales de la médula ósea o, en caso de persistencia de las mismas, aportando información sobre mecanismos de resistencia al tratamiento. La respuesta medular por tanto puede ser un factor predictivo de la respuesta sistémica, tanto en el contexto de la enfermedad mínima residual postcirugía como en la enfermedad metastásica.

Otro aspecto que se quiere analizar, no estudiado hasta ahora, es averiguar si las células tumorales ocultas en médula ósea expresan enfermedad residual en pacientes diagnosticadas de cáncer de mama y sin evidencia de recaída, en las que se aprecia elevación de marcadores tumorales séricos, con el fin de disponer

de un elemento objetivo que evaluar, lo que permitiría un tratamiento precoz o, al menos, plantear ensayos clínicos dirigidos a determinar su beneficio. En estas pacientes es esperable detectar progresión de la enfermedad en un plazo de 3-12 meses, pero no está indicado por ahora el tratamiento hasta que se manifieste la recaída.

De forma marginal se desea también conocer si la realización de este análisis en sangre periférica, menos cruento y más sencillo, podría suplir a la determinación en médula ósea, lo que facilitaría el estudio de la enfermedad micrometastásica y permitiría monitorizar más estrechamente el tratamiento.

Con el fin de demostrar estas hipótesis se han planteado los siguientes objetivos:

II.2. OBJETIVOS

Objetivo principal:

Determinar el efecto de la quimioterapia en la eliminación de las células tumorales ocultas (micrometástasis) en médula ósea -identificadas inmunocitoquímicamente como células citoqueratina-positivas- en dos situaciones clínicas: un grupo de pacientes con cáncer de mama primario (localizado) candidatas a recibir quimioterapia adyuvante, y un grupo de pacientes en recaída en las que el proyecto terapéutico incluye quimioterapia para la enfermedad avanzada.

En esta segunda población, con enfermedad medible o evaluable, se plantea también el objetivo de relacionar la presencia de células tumorales con el comportamiento clínico del tumor:

- averiguar la relación entre la presencia de células micrometastásicas en médula ósea y las diferentes localizaciones de metástasis.
- comparar la variación en el contenido de células tumorales ocultas en médula ósea tras el tratamiento quimioterápico con la respuesta clínica, para determinar si los resultados pueden predecir la respuesta del tumor a la quimioterapia

Objetivos secundarios:

1. Estudiar, en una muestra de pacientes con elevación de marcadores tumorales y sin evidencia clínica de recaída, si las células micrometastásicas de cáncer de mama detectadas en médula ósea (enfermedad mínima residual) representan signos objetivos de enfermedad en esta situación.

2. Determinar la relación entre la presencia de células tumorales micrometastásicas en médula ósea y en sangre periférica en pacientes con cáncer de mama, con el fin de averiguar si la determinación en sangre periférica puede sustituir al análisis de la médula ósea.

III. PACIENTES Y METODO

III.1. PACIENTES

En total entraron en el estudio 220 pacientes con diagnóstico de cáncer de mama tratadas y seguidas en la consulta de Oncología del Hospital Clínico Universitario de Valencia entre enero de 1998 y febrero de 2001.

III.1.1. Estudio del objetivo principal : se incluyeron dos grupos de pacientes:

1. Pacientes con reciente diagnóstico de cáncer de mama localizado, estadio I-III, e indicación de quimioterapia adyuvante: 152 pacientes.
2. Pacientes con cáncer de mama metastásico, de inicio o en la recaída, con indicación de tratamiento quimioterápico para la enfermedad avanzada: 43 pacientes.

Pacientes de tratamiento adyuvante (grupo 1):

El primer grupo está formado por 152 pacientes que fueron vistas por primera vez tras el diagnóstico, entre febrero de 1999 y enero de 2001. La mayoría de las pacientes (132 pacientes, 88%) entraron en el estudio entre 4 y 8 semanas después de la intervención quirúrgica, antes de comenzar la quimioterapia adyuvante. Algunas de ellas, sin embargo (20 pacientes, 13%), fueron incluidas en el momento del diagnóstico y recibieron quimioterapia neoadyuvante previa a la intervención quirúrgica.

Las características de las pacientes están descritas en la tabla 7. La mediana de edad fue de 51 años (30-77). La distribución por estadios fue: Estadio I: 38 (26%) pacientes; estadio II: 72 (47%); estadio III: 37 (24%). El tipo histológico más frecuente fue el de carcinoma ductal infiltrante (85%). El tamaño tumoral predominante fue T2 (63 pacientes, 41%). En 59 (39%) pacientes el tamaño fue T1 y T3-4 en 23 (15%). En cuanto a la afectación ganglionar, 62 (41%) pacientes no presentaban ninguna afectación mientras que 47 (31%) tenían entre 1 y 3 ganglios afectos, 18 (12%) presentaron 4-9 ganglios afectos y 18 (12%) más de 10 ganglios. Se determinó el grado histológico (Scarff-Bloom) en el 88% de las pacientes: 56 (37%) se presentaron con grado histológico 2, 48 (31%) con grado 3 y sólo 14 (9%) tenían grado histológico 1. Los receptores estrogénicos y de progesterona, conocidos en el 62% de las pacientes, fueron positivos en el 41% y

42%, y negativos en el 20 y 19% de las pacientes, respectivamente. Se realizó determinación de c-erbB2 mediante un test comercial con anticuerpo anti-Her2/neu en el 46% de las pacientes, con resultado negativo en 35 (0, +) y positivo en 25 (++, +++).

La técnica quirúrgica consistió en mastectomía radical o tumorectomía, dependiendo del tamaño y localización tumoral, con márgenes de seguridad adecuados, y linfadenectomía axilar en todas las pacientes.

Se realizó estudio de extensión a todas ellas, que incluyó radiografía de tórax, ecografía abdominal, gammagrafía ósea y analítica completa con marcadores tumorales CA 15.3 y CEA.

Todas las pacientes fueron tratadas con quimioterapia adyuvante. Los criterios para administrar quimioterapia fueron, según los criterios habituales: estudio de extensión negativo, afectación axilar o, en las pacientes sin ganglios afectados, uno o más de los siguientes factores de moderado o alto riesgo: tamaño mayor o igual a 2 cm, receptores hormonales negativos, grado histológico > 1 , edad de 35 años o menor, además de presentar un estado general adecuado (ECOG menor o igual a 2), parámetros hematológicos, hepáticos y renales dentro de la normalidad y ausencia de enfermedad grave concomitante. 132 (88%) pacientes entraron en el estudio después de la cirugía, antes de comenzar el tratamiento adyuvante. Se administró quimioterapia neoadyuvante a 20 (13%) pacientes, 14 de ellas dentro de ensayos clínicos randomizados que incluían esta opción de entrada y las otras 6 por presentar un estadio localmente avanzado.

El esquema de quimioterapia fue variable pues las pacientes fueron incluidas en diferentes ensayos clínicos, según las características y factores de riesgo. Excepto 3, todas recibieron esquemas basados en antraciclinas -asociadas a taxanos en 39 (25%) de los casos- y 18 de ellas entraron en ensayos clínicos que contemplaban la realización de quimioterapia intensiva con trasplante autólogo de célula germinal de sangre periférica. Tras finalizar la quimioterapia las pacientes con cirugía conservadora o afectación axilar recibieron radioterapia local o loco-regional, y se prescribió hormonoterapia a las pacientes en las que se demostró positividad de receptores hormonales.

112 pacientes de este grupo aceptaron una segunda extracción de médula ósea, que se realizó 6-12 semanas después del último ciclo de quimioterapia adyuvante.

Pacientes con enfermedad metastásica (grupo 2):

El segundo grupo incluyó 43 pacientes diagnosticadas de cáncer de mama metastásico entre enero de 1998 y febrero de 2001, algunas de ellas con estadio IV en el momento del diagnóstico, y la mayoría en recaída tras haber sido tratadas previamente por cáncer de mama, en las que el proyecto terapéutico incluyó quimioterapia de primera línea para enfermedad metastásica, y aceptaron participar en el estudio. El criterio para administrar quimioterapia fue la recaída en paciente con receptores hormonales negativos, o en localización visceral, o muy sintomática, o con posibilidad de rescate quirúrgico, o en localización que hiciese prever un compromiso vital, o pacientes que progresaron a hormonoterapia previa.

Las características de las pacientes de este grupo se recogen en las tablas 7 (características en el momento del diagnóstico inicial de cáncer de mama) y en la tabla 8 (características en el momento de la entrada en el estudio). La mediana de edad al diagnóstico fue 46 años. El tipo histológico predominante fue carcinoma ductal infiltrante (32/43 pacientes, 74%). La enfermedad se presentó en estadio I en 4 (9%) pacientes, II en 20 (46.5%) y III en 10 (23%), mientras que otras 6 (14%) pacientes eran metastásicas ya al diagnóstico. El tamaño tumoral predominante fue T2 (18 pacientes, 42%). En 8 (19%) pacientes el tamaño fue T1 y T3-4 en 10 (23%). Con respecto a la afectación ganglionar, 11 (26%) pacientes no presentaban ninguna afectación, 14 (33%) tenían entre 1 y 3 ganglios afectados, 6 (14%) presentaron 4-9 ganglios afectados y 5 (11%) más de 10 ganglios. La mayor parte de las pacientes presentaron grado histológico 2 (32%) y 3 (18%), aunque el parámetro era desconocido en un 41%. Los receptores de estrógenos y progesterona, determinados en un 70% de las pacientes, fueron positivos en el 54% y 42% respectivamente. La sobreexpresión de erbB2 fue desconocida en la mitad de las pacientes, positiva en 8 (18%) y negativa en 14 (33%)

De las 37 pacientes no metastásicas al diagnóstico, 87% habían recibido tratamiento adyuvante, la mayoría (30 pacientes, 81%) con esquemas que contenían antraciclinas, y 9 (24%) habían sido incluidas en protocolos con

quimioterapia intensiva y trasplante autólogo de célula germinal de sangre periférica. Igual que en el grupo anterior, las pacientes con receptores hormonales positivos habían recibido hormonoterapia adyuvante, y radioterapia loco-regional en caso de cirugía conservadora o más de 4 ganglios axilares afectados.

La mediana de tiempo hasta la progresión fue de 31 meses (0-116). Las localizaciones de metástasis en el momento de la entrada en el estudio se reflejan en la tabla 8 y en la figura 8. Sólo 2 pacientes del grupo presentaron recaída únicamente local, y 40 recidivaron en localizaciones sistémicas, de las cuales la más frecuente fue la recaída ósea (25 pacientes, 58%), seguida por la ganglionar y en partes blandas (15 pacientes, 35%) y la pleuro-pulmonar (13 pacientes, 31%). 16 (37%) pacientes presentaron una única localización de recaída, mientras que 18 (42%) recayeron en 2 sitios a la vez y 8 (19%) en 3 ó más.

Las 43 pacientes recibieron quimioterapia para la enfermedad metastásica. La mayoría habían recibido antraciclinas como tratamiento adyuvante, por lo que se administró quimioterapia basada en taxanos a 32 pacientes (75%), en combinación con antraciclinas en 7 de los casos (16%), y distintas combinaciones de antraciclinas sin taxanos a 9 (21%). Las que demostraron quimiosensibilidad y no habían recibido quimioterapia intensiva en el tratamiento adyuvante (13 pacientes, 30%) fueron tratadas con quimioterapia a dosis altas y trasplante autólogo de célula germinal de sangre periférica.

En 25 pacientes se pudo realizar una segunda determinación de células tumorales en médula ósea, en el momento de la primera valoración de respuesta postquimioterapia.

III. 1. 2. Estudio de los objetivos secundarios

a. El estudio de enfermedad mínima residual en pacientes con marcadores elevados se realizó en un tercer grupo (grupo 3) de 25 pacientes con diagnóstico de cáncer de mama no metastásico, o metastásico en respuesta completa, en las que se detectó durante el seguimiento, entre enero de 1998 y febrero de 2001, elevación del marcador tumoral sérico CA15.3 en dos determinaciones repetidas, sin que el estudio de extensión exhaustivo lograra poner de manifiesto recaída de la enfermedad. Consideramos valor normal el estándar de nuestro laboratorio (30 U/ml). El nivel de elevación del marcador fue

variable, entre 32 y 425 U/ml, con una mediana de 52, y todas las pacientes se encontraban asintomáticas y con buen estado general. En estas pacientes se realizó, según la práctica habitual en el Servicio, estudio diagnóstico completo con TAC torácico y abdominal, gammagrafía ósea, mamografía y estudio de médula ósea. En algunas se realizaron otras exploraciones más específicas, según criterio clínico, como resonancia nuclear magnética (RNM) o tomografía por emisión de positrones (PET). Otras 26 pacientes presentaron elevación del marcador CA15.3 en este período, pero en ellas el estudio realizado y/o la clínica demostraron alguna localización de metástasis.

Las características de las pacientes de este grupo en el momento del diagnóstico inicial de cáncer de mama están resumidas en la tabla 7. La mediana de edad fue 51 años (31-71). Al diagnóstico casi todas presentaron un carcinoma ductal infiltrante (80%, 20 pacientes), y la mayoría presentaron estadios II (9, 36%) ó III (7 pacientes, 28%). 2 pacientes eran ya metastásicas al diagnóstico, pero se encontraban al entrar en el estudio en situación de respuesta completa, sin evidencia de progresión y con marcadores normales. El tamaño tumoral predominante fue T2 (10 pacientes, 40%). En 5 (20%) pacientes el tamaño fue T1 y T3-4 en otras 5 (20%). En cuanto a la afectación ganglionar, 8 (32%) pacientes fueron N₀, 4 (16%) tenían entre 1 y 3 ganglios afectos, otras 6 (24%) presentaron 4-9 ganglios afectos y 3 (12%) pacientes tenían más de 10 ganglios axilares afectos. Los receptores de estrógenos y progesterona en la pieza inicial sólo son conocidos en la mitad de las pacientes, de las cuales 6 (24%) presentaron receptores de estrógenos y de progesterona positivos. De las 15 pacientes en las que se conoce el grado histológico, 10 tenían grado 2 y 3 grado 3. Más de la mitad (13 pacientes, 52%) recibieron quimioterapia adyuvante con esquemas basados en antraciclinas, con posterior hormonoterapia en caso de receptores positivos, y 4 fueron tratadas sólo con hormonoterapia.

La mediana de tiempo transcurrido desde el diagnóstico hasta la elevación de los marcadores fue de 43 meses (4-104). En el momento de la inclusión en el estudio 21 pacientes estaban libres de enfermedad y 4 de ellas eran metastásicas (local o partes blandas) en respuesta completa post-tratamiento o sin evidencia de enfermedad tras cirugía (estadio IV-NED), y se encontraban en seguimiento en las consultas externas según el procedimiento habitual (revisión anual en caso de pacientes sin afectación axilar, o cada 6 meses en caso de ganglios positivos, con determinación de marcadores CEA y CA 15.3 en cada consulta, y estudio de

extensión con radiografía de tórax, ecografía abdominal, gammagrafía ósea y mamografía anuales). Tras detectarse la elevación del marcador sin evidencia de recaída en los estudios realizados, se programó un seguimiento más estrecho, cada 3 meses con visita clínica y analítica y cada 6 meses con exploraciones complementarias, si no había manifestaciones clínicas orientativas de progresión

b. Determinación de células tumorales en sangre periférica: Se realizaron 60 extracciones conjuntas de sangre periférica y médula ósea a 47 pacientes, elegidas aleatoriamente de entre el grupo completo de 220 pacientes.

TABLA 7.- Características de los tres grupos de pacientes en el momento del diagnóstico inicial de cáncer de mama

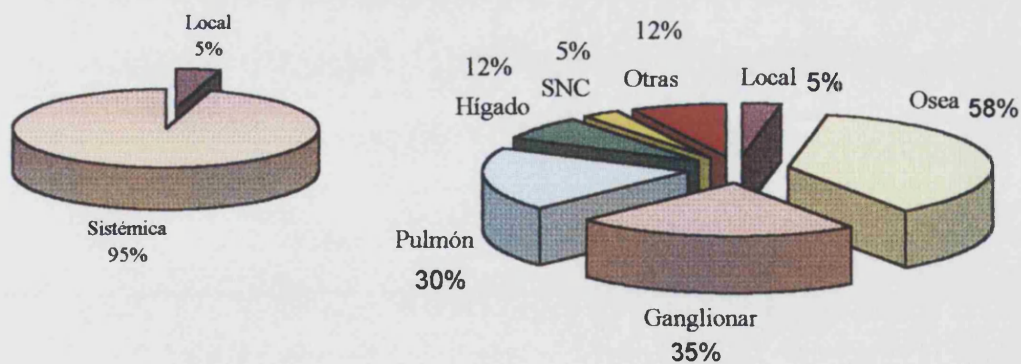
| | GRUPO 1 | GRUPO 2 | GRUPO 3 |
|-------------------------------------|-----------------|-----------------|----------------|
| Nº total | 152 | 43 | 25 |
| Edad mediana (rango) | 52 (30-77 años) | 46 (33-67 años) | 51 (31-71) |
| <37 | 18 (12%) | 6 (14%) | 3 (12%) |
| 38-49 | 42 (28%) | 19 (44%) | 7 (28%) |
| 50-69 | 73 (48%) | 13 (30%) | 9 (36%) |
| >70 | 11 (7%) | 0 | 2 (8%) |
| Estadio | | | |
| I | 38 (26%) | 4 (9%) | 4 (16%) |
| IIA | 72 (47%) | 20 (46%) | 9 (36%) |
| III | 37 (24%) | 10 (24%) | 7 (28%) |
| IV | - | 6 (14%) | 2 (8%) |
| Tipo histológico | | | |
| Ductal | 129 (85%) | 33 (77%) | 20 (80%) |
| Lobulillar | 16 (10%) | 5 (11%) | 1 (4%) |
| Otros | 2 (1%) | 0 | 0 |
| Tamaño | | | |
| T1 | 59 (38.8%) | 8 (19%) | 5 (20%) |
| T2 | 63 (41.4%) | 18 (42%) | 10 (40%) |
| T3-4 | 23 (15.2%) | 10 (23%) | 5 (20%) |
| Afectación axilar | | | |
| N0 | 62 (41%) | 11 (26) | 8 (32%) |
| N 1-3 | 47 (31%) | 14 (33) | 4 (16%) |
| N 4-9 | 18 (12%) | 6 (14) | 6 (24%) |
| N >=10 | 18 (12%) | 5 (11) | 3 (12%) |
| Grado histológico | | | |
| 1 | 14 (9%) | 3 (7%) | 2 (8%) |
| 2 | 56 (36.8%) | 14 (33%) | 10 (40%) |
| 3 | 48 (31.6%) | 8 (18%) | 3 (12%) |
| Desconocido | 34 (22%) | 18 (41%) | 10 (40%) |
| Receptores hormonales | | | |
| RE + | 63 (41.4%) | 9 (21%) | 5 (20%) |
| RE - | 31 (20.4%) | 21 (49%) | 6 (24%) |
| RPg+ | 64 (42%) | 13 (30%) | 5 (20%) |
| RPg- | 29 (19%) | 17 (40%) | 6 (24%) |
| Desconocidos | 58 (38%) | 13 (30%) | 14 (56%) |
| c-erbB2 | | | |
| Neg (0, +) | 35 (23%) | 14 (33%) | 4 |
| Positivo (++, +++) | 25 (16%) | 8 (19%) | - |
| Desconocido | 92 (60%) | 21 (48%) | 21 (84%) |
| Momento de la extracción | | | |
| Extracción pre-cirugía | 20 (13%) | - | - |
| Extracción post-cirugía | 132 (88%) | - | - |
| Tipo de QT inicial (ady/neo) | | | |
| Antraciclinas (sin taxanos) | 102 (72%) | 29 (78%) | 13 (52%) |
| Taxanos (con antraciclinas) | 39 (26%) | 2 (5%) | - |
| Otros | 3 (2%) | 2 (5%) | 5 (20%) |
| TASPE | 18 (12%) | 9 (24%) | 7 (28%) |

RE: Receptores estrogénicos. RP: receptores de progesterona. QT: quimioterapia. TASPE: trasplante autólogo de sangre periférica. GRUPO 1: pacientes con enfermedad localizada de reciente diagnóstico. GRUPO 2: pacientes metastásicas. GRUPO 3: Pacientes con elevación de marcadores tumorales séricos

TABLA 8.- Características de las pacientes del grupo 2 en la recaída

| | N (%) |
|---|--------------------|
| N total | 43 |
| Tiempo hasta la recaída (mediana) | 31.1 meses (0-116) |
| Localización de la recaída | |
| Local | 2 (5%) |
| Sistémica | 41 (95%) |
| - Osea | 25 (58%) |
| - Ganglionar | 15 (35%) |
| - Visceral | 20 (47%) |
| Pulmón | 13 (30%) |
| Hígado | 5 (12%) |
| SNC | 2 (5%) |
| Otras | 5 (12%) |
| Nº de localizaciones de metástasis | |
| 1 | 19 (45%) |
| 2 | 14 (33%) |
| 3 ó más | 9 (21%) |
| Tratamiento en la recaída | |
| Taxanos sin antraciclinas | 25 (58.1%) |
| Antraciclinas sin taxanos | 9 (21%) |
| Taxanos y antraciclinas | 7 (16%) |

FIG. 8.- Localizaciones de metástasis en las pacientes del grupo 2 en el momento de entrar en el estudio



III.2. METODOS

III.2.1. Extracción de médula ósea

Se realizó extracción de médula a las pacientes de los tres grupos en diferentes momentos:

- En los grupos 1 y 2 el estudio contempla como objetivo evaluar la respuesta a quimioterapia, neoadyuvante, adyuvante o para la enfermedad metastásica. Por tanto se efectuó una primera extracción antes de comenzar el tratamiento y una segunda al cabo de 1-6 meses de finalizarlo (en el caso de las pacientes metastásicas la segunda determinación se realizó en el momento de la primera valoración de respuesta). Sólo 113 pacientes del primer grupo (75%) y 25 del segundo (58%) aceptaron la segunda extracción.
- En las pacientes del tercer grupo la extracción de médula tuvo lugar en el momento en que se constató elevación del marcador tumoral CA 15.3 > 30U/ml en dos determinaciones repetidas, con estudios de extensión negativos.

La extracción se realizó mediante aspirado y biopsia de ambas crestas ilíacas posteriores. Después de 117 extracciones, dado que ninguna muestra dió resultado positivo por técnica convencional en las pacientes con enfermedad no metastásica, acordamos no realizar más biopsias en este grupo de pacientes.

Todas las pacientes otorgaron su consentimiento informado. La extracción se realizó mediante la técnica habitual, bajo anestesia local, en el Hospital de Día. Se obtuvo un total de 20 cc de muestra de aspirado (10 cc en cada localización), que fue recogido con EDTA (ácido etilendiaminotetracético) dipotásico y procesado inmediatamente. La biopsia se realizó también bilateralmente tras efectuar la aspiración, y el material fue incluido en formol para su remisión al laboratorio de Anatomía Patológica. No hubo complicaciones infecciosas ni hematomas locales ni otro tipo de complicaciones clínicamente relevantes. La mayoría de las pacientes refirieron dolor en el área de punción, generalmente tolerable sin necesidad de analgésicos, y de corta duración. Aunque en algunas de ellas tuvo la suficiente entidad como para no prestarse a realizar más determinaciones, el motivo de no aceptar la segunda extracción fue más bien evitar el traslado al Hospital y la tensión psíquica que suponía la prueba para estas pacientes.

Conjuntamente con 60 extracciones de médula se obtuvo además 20 cc de sangre periférica, que fue también recogida en tubos con EDTA dipotásico y enviada al laboratorio para su procesamiento inmediato.

III.2.2. Procesamiento de las muestras

La técnica de procesamiento ha sido descrita repetidamente^{56, 70, 73}. Cada muestra de aspiración de médula ósea y de sangre periférica fue diluida en PBS (Gibco, Life Technologies, Roskilde, Dinamarca) y separada por centrifugación mediante gradiente de densidad (densidad de 1077 g/ml) con Lymphoprep (Nycomed Pharma AS, Oslo, Noruega), a 400 g durante 30 minutos, a temperatura ambiente. La interfase obtenida, tras lavado con PBS, fue resuspendida en PBS ajustando la concentración a 1×10^6 células mononucleadas/600 μ l, hasta obtener un total de 2×10^6 células, que se repartieron en dos portaobjetos ya preparados comercialmente, cada uno con capacidad para 1×10^6 células divididas en dos pocillos. Para cada muestra se preparó un tercer portaobjetos con 500.000 células, para utilizar como control negativo. Las muestras se dejaron secar al aire durante 18 horas en ambiente seco, y posteriormente se almacenaron a -20°C hasta que se procedió a la tinción.

Todas las muestras de aspirado de médula ósea y de sangre periférica se analizaron inmucitoquímicamente de forma cuantitativa en busca de células con expresión de citoqueratina, mediante la técnica de fosfatasa alcalina-antifosfatasa alcalina (FAAFA) con el Anticuerpo monoclonal antiCK A45-B/B3 en un total de 2×10^6 células mononucleadas de MO en cada paciente. Utilizamos el preparado comercial EPIMET (EPIMET Epithelial Cell Detection Kit, Baxter Europe, Micromet, Alemania) de detección de células epiteliales en muestras de células mononucleadas. La técnica consta de varias fases: tras descongelar las muestras a temperatura ambiente e incubarlas con una solución de permeabilización y después con otra de fijación, se procede a la incubación con el anticuerpo, recubriendo los 4 primeros pocillos con el conjugado de fosfatasa alcalina y Ac A45-B/B3, y el pocillo control con el conjugado de Ac inespecífico y fosfatasa alcalina y dejándolos 45 minutos en la cámara húmeda. Transcurrido el tiempo, se añade la solución de tinción, compuesta de naftol fosfato, nitrito sódico, fucsina y levamisol, este último como bloqueante de fosfatasa alcalina endógena. No se utiliza solución de contratinción, para identificar con mayor facilidad las células teñidas. Las muestras son lavadas cuidadosamente dos

veces con PBS entre cada incubación. Tras diez minutos de incubación se recubren los portaobjetos con el medio de montaje, una solución de glicerina y gelatina (Glicergel, DAKO), que permite el almacenamiento de las mismas, preparadas ya para la evaluación microscópica.

III.2.3. Evaluación microscópica

La evaluación microscópica, mediante observación detenida de todos los portaobjetos, campo por campo, y recuento de todas las células, fue realizada por dos personas distintas separadamente. La evaluación de las células no se apoyó únicamente en la tinción, sino que se utilizaron otros criterios morfológicos así como la intensidad de la tinción inmunocitológica: la extensión se clasificó como negativa si era muy débil o no cumplía los criterios de malignidad. Inicialmente se decidió considerar positivas todas las muestras en las que se detectara una o más células citoqueratina positivas con las características citadas, pero posteriormente modificamos el criterio, al detectar discordancia entre los dos observadores en las muestras con una única célula “positiva”, que en todos los casos tenía un aspecto dudoso. Decidimos por tanto considerar positiva la médula a partir de dos o más células inmunoteñidas y con las características descritas. Los controles negativos no revelaron ninguna célula positiva. Tampoco se detectó positividad en 20 muestras de médula ósea correspondientes a personas sanas.

Las muestras de biopsia de médula se estudiaron de forma convencional en el servicio de Anatomía Patológica, sin conocer los resultados del estudio inmunocitoquímico del aspirado.

III.3. Análisis estadístico

Este proyecto de investigación fue diseñado como un estudio de cohortes prospectivo. La población de estudio está constituida por pacientes con cáncer de mama primario o metastásico con las divisiones y características descritas previamente. El tamaño muestral total fue de 220 pacientes, repartidas en tres grupos de 152, 43 y 25 pacientes respectivamente, como ya se ha descrito, que se fueron incluyendo a medida que se veían en la consulta pacientes con los criterios requeridos.

La base de datos se diseñó y gestionó mediante el programa Microsoft Access 97. El análisis estadístico de los datos fue efectuado con el programa SPSS 10.0 para Windows.

En una fase inicial del estudio se llevó a cabo un análisis descriptivo de la muestra, calculando para ello los principales estadísticos de resumen para cada una de las variables de interés. Así, para las variables cualitativas nominales, se analizaron las proporciones presentes en la muestra. Para las variables cualitativas ordinales se calculó la mediana y el rango, así como las proporciones observadas en cada categoría. Para las variables cuantitativas, se calcularon los estadísticos clásicos como la media o la varianza, así como estadísticos robustos como la mediana o el rango. Además, se contrastó su normalidad mediante el test de Kolmogorov-Smirnov-Lilliefors y utilizando gráficos de probabilidad normal.

Con el fin de poder analizar posibles diferencias significativas en las medias de las variables cuantitativas de interés entre subgrupos de la muestra, se ha empleado la prueba t para dos muestras independientes, previa comprobación de la normalidad de la variable objeto de estudio mediante el procedimiento descrito en el apartado anterior. Además, se analizaron posibles diferencias entre las frecuencias observadas de diferentes variables cualitativas para diferentes subgrupos de la muestra mediante la prueba chi-cuadrado de Pearson. Estos análisis univariantes también tenían como objetivo localizar posibles factores de interés, que incluir en un futuro análisis multivariante.

Entre los objetivos del estudio no se incluyó el análisis de supervivencia debido al previsiblemente escaso número de eventos, condicionado por un seguimiento corto de las pacientes. Aun así, se analizó la supervivencia global y libre de recaída utilizando la estimación de Kaplan-Meier en los grupos 2 y 3 como un acercamiento preliminar al problema. Además, se trató de detectar diferencias significativas en la supervivencia entre los pacientes con médula ósea positiva o negativa, utilizando para ello el test Log-rank de comparación de supervivencias entre ambos grupos. Aunque estos grupos 2 y 3 son de peor pronóstico y el número de eventos ha sido algo mayor, es insuficiente para abordar el problema del análisis de la supervivencia, tanto global como por grupos de pacientes, de forma que el test empleado posea la potencia necesaria.

IV. RESULTADOS

Se realizaron en total 357 extracciones de médula ósea y 60 extracciones de sangre periférica, que fueron procesadas y evaluadas en la forma descrita en Métodos. Se realizó extracción de médula en el momento del diagnóstico a 152 pacientes con cáncer de mama primario candidatas a quimioterapia adyuvante (grupo 1), de las cuales 112 aceptaron una segunda extracción postquimioterapia. Del mismo modo, se analizó la médula ósea de 42 pacientes con carcinoma de mama metastásico y criterios de tratamiento quimioterápico (grupo 2), 25 de las cuales aceptaron la 2ª extracción. Otras 25 pacientes con marcadores tumorales séricos elevados y sin evidencia de recaída constituyeron el grupo 3, con una única determinación en el momento de la elevación del marcador, y posterior seguimiento hasta la progresión. Se estudió además la sangre periférica conjuntamente con 60 extracciones de médula, que corresponde a 47 pacientes pertenecientes a los tres grupos anteriores.

Las células tumorales ocultas aparecen, como se ha descrito repetidamente¹⁴⁰, como células redondeadas de mayor tamaño que las células hematopoyéticas circundantes, con relación núcleo-citoplasma disminuida, intensa y homogéneamente teñidas de rojo, aisladas o en racimos celulares (fig. 9 y 10). La concordancia en la evaluación de las muestras fue de 100% en los resultados negativos, pero en las muestras positivas apreciamos un porcentaje de discordancia de 10%. Revisadas conjuntamente las preparaciones con resultado no coincidente, todas correspondieron a muestras con sólo una célula positiva, que uno de los evaluadores había considerado tumoral mientras que el otro la consideraba negativa, a causa de la observación de un tipo de células teñidas, de tamaño mayor que las tumorales, tinción irregular y aspecto plegado (fig. 11), semejantes a las que aparecían también en otras muestras en mayor número, o junto con células verdaderamente neoplásicas, y cuyo aspecto permitió identificarlas como células epiteliales probablemente epidérmicas. Dado el carácter dudoso de éstas células y dado que en ninguna de las preparaciones con una sólo célula teñida el aspecto de ésta era claramente neoplásico, finalmente decidimos considerar como negativas todas las muestras en las que sólo aparecía una célula positiva para citoqueratina. Por tanto consideramos la médula positiva cuando detectamos más de una célula citoqueratina-positiva mediante análisis inmunocitoquímico. Aun así, los resultados estadísticos no difieren de los

FIG. 9.- Aspecto de las células citoqueratina-positivas en médula ósea tras la inmunotinción con el anticuerpo monoclonal anticitoqueratina A45-B/B3. La imagen muestra células tumorales aisladas, homogéneamente teñidas, con tamaño mayor que las células hematopoyéticas circundantes, núcleo grande y relación núcleo-citoplasma disminuída (1250x)

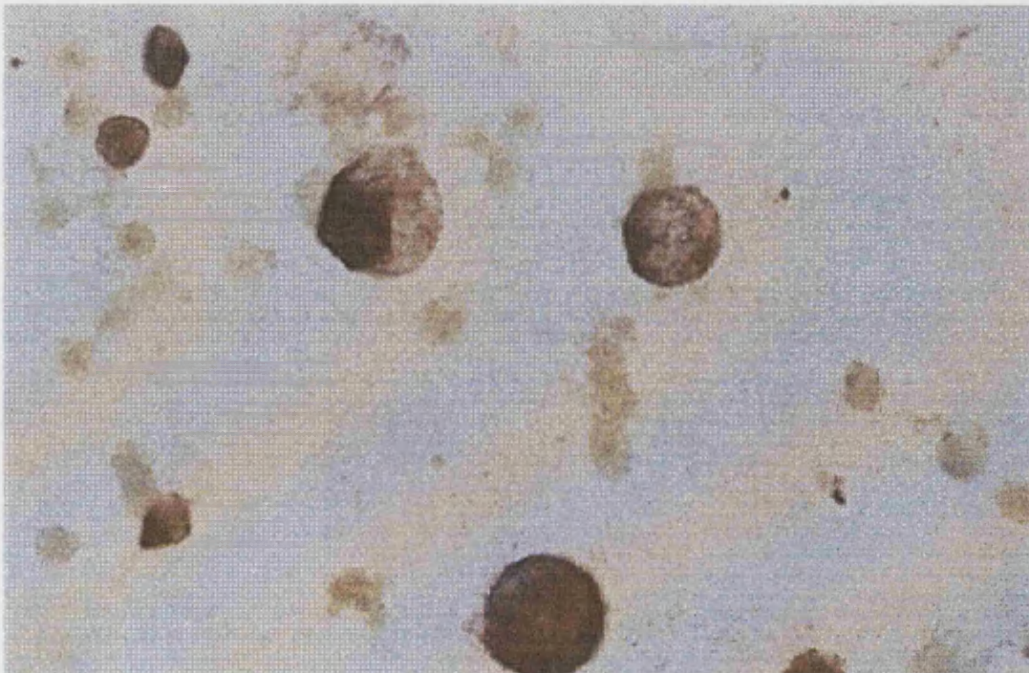


FIG. 10.- Células tumorales ocultas en médula ósea detectadas inmuno-citoquímicamente con el anticuerpo anti-citoqueratina A45/B-B3. Las fotografías muestran células agrupadas en racimos o "cluster, que son una imagen patognomónica de micrometástasis, cuando aparecen. (Fotografía superior: 1250x. Fotografía inferior: detalle de un grupo celular que permite apreciar el tamaño del núcleo y la relación núcleo-citoplasma. 2000x)

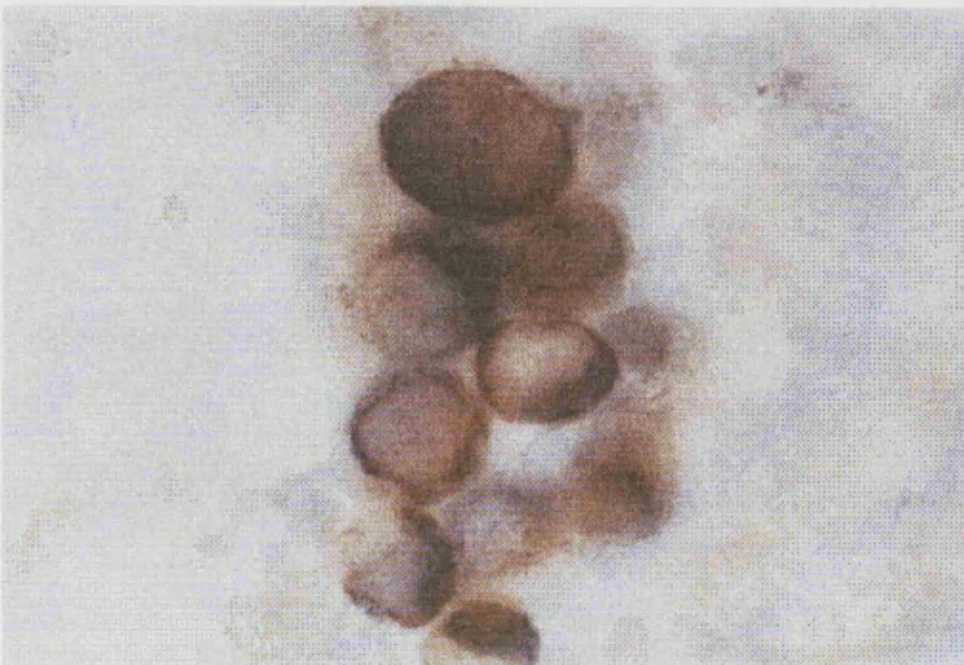
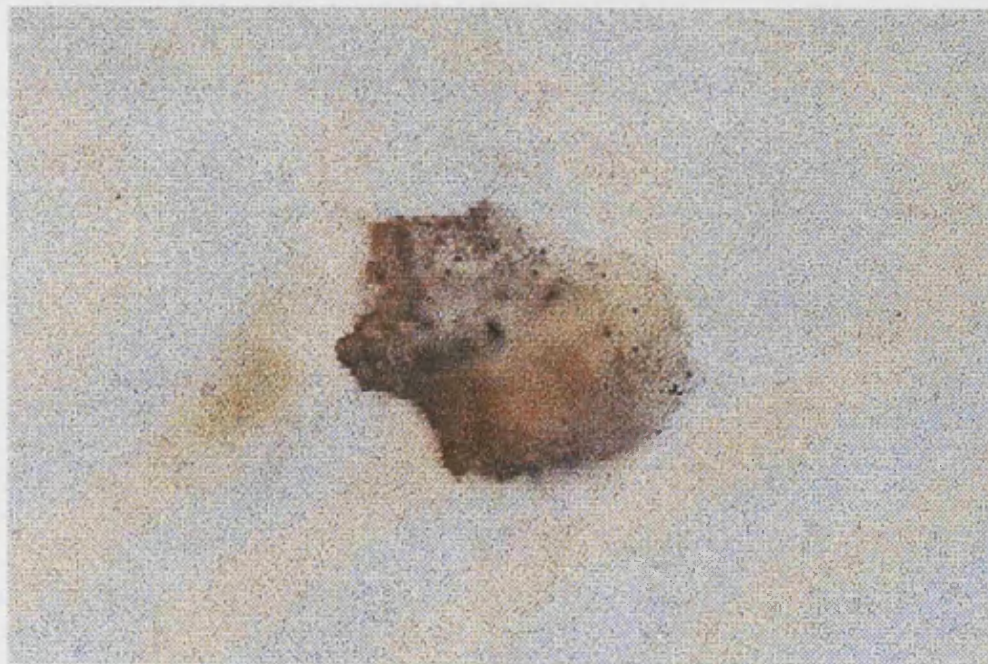


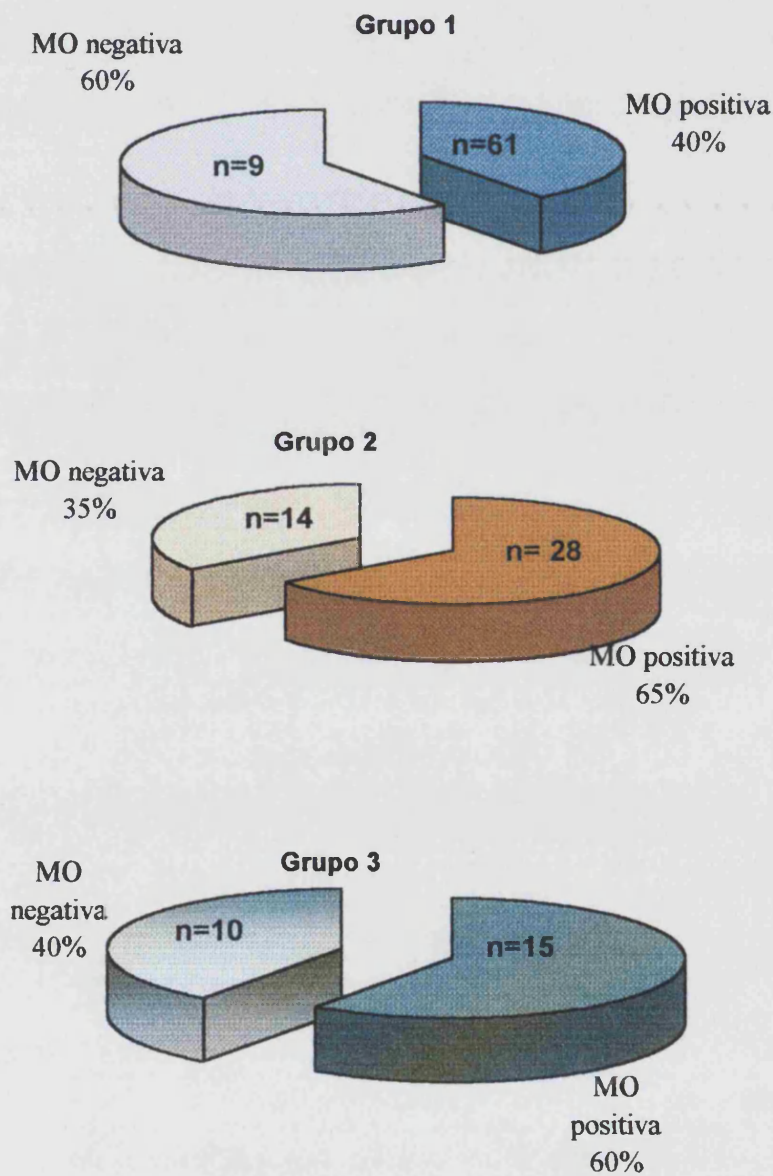
FIG. 11.- Células citoqueratina positivas de aspecto no tumoral: obsérvese la tinción irregular, el tamaño en relación con las imágenes de las figuras anteriores, la forma poligonal y la superficie plegada. De acuerdo con otros autores⁷², consideramos estas células como falsos positivos, correspondientes a células epiteliales epidérmicas, y las preparaciones que sólo presentaron células de este tipo se consideraron negativas. (1250x)



obtenidos cuando se considera positiva la médula a partir de una sólo célula detectada.

La figura 12 resume la frecuencia de positividad en médula ósea en los tres grupos de pacientes en el momento de la entrada en el estudio, resultados que comentaremos con detenimiento.

FIG 12: Frecuencia de detección de células tumorales ocultas en médula ósea en el grupo de tratamiento adyuvante (grupo 1), de enfermedad metastásica (grupo 2), y de marcadores tumorales elevados (grupo 3)



IV.1. Evaluación del efecto de la quimioterapia sobre la eliminación de células tumorales en médula ósea.

IV. 1. 1. Pacientes de tratamiento adyuvante (grupo 1)

a) Frecuencia de detección de células tumorales aisladas en médula ósea

En la primera determinación, al diagnóstico, se detectaron células citoqueratina-positivas en la médula ósea de 61/152 (41%) pacientes, mientras que 91/152 (59 %) presentaron médula ósea negativa: 0 (77 pacientes) ó 1 (14 pacientes) células (Fig.12). La mediana de células tumorales en las pacientes con médula positiva fue de 7 células por cada 2 millones de células mononucleadas analizadas (rango: 2-24 células/2x10⁶). En la mayoría de los casos (53/60, 88%) las células aparecieron como hallazgos dispersos, aunque en 7/60 muestras detectamos células micrometastásicas agrupadas. El estudio convencional de la biopsia bilateral de médula ósea no demostró ningún resultado positivo en las 117 pacientes en las que se realizó, de las que 43 (37%) presentaron médula positiva por inmunocitoquímica.

La tabla 9 muestra la distribución de resultados en la médula ósea según los diferentes factores pronóstico clásicos al diagnóstico. No se encontró asociación estadísticamente significativa entre la positividad o negatividad medular y ninguno de los factores analizados. La distribución de frecuencias de positividad-negatividad (40/60) se mantiene cuando se estratifica a las pacientes por factores de riesgo. Presentan médula ósea positiva 27 (46%) de las 59 pacientes con tamaño tumoral menor o igual a 2 cm (T1); 26 (41%) de las 62 pacientes sin afectación ganglionar axilar; 20 (52%) de las 38 pacientes con estadio T1. En las pacientes con grado histológico 1 y receptores de estrógenos y progesterona positivos la frecuencia de detección de células tumorales en médula ósea es menor (alrededor de 36%), pero la diferencia no alcanza significación estadística. En las pacientes del grupo de edad más joven (<37 años) y en las que presentaron un tumor con grado histológico 3 se apreció mayor frecuencia de positividad medular, que no fue significativa estadísticamente.

En relación con el momento de la extracción, como muestra la figura 13, la médula ósea fue positiva en 49/132 (38%) pacientes a las que se practicó la extracción después de la cirugía, y en 12/20 (60%) de las que llevaron tratamiento quimioterápico neoadyuvante y en las que, por tanto, la primera

TABLA 9.- Relación entre frecuencia de células tumorales ocultas en médula ósea y factores pronóstico clásicos en las pacientes de tratamiento adyuvante (grupo 1).

| Factor | Total | MO negativa (%) | MO positiva (%) | p |
|------------------------------|------------|-----------------|-----------------|------|
| <u>Todas las pacientes</u> | 152 | 90 (60%) | 60 (40%) | - |
| <u>Edad mediana (rango)</u> | 51 (30-77) | 51 | 51 | 0.6 |
| <=37 | 18 (12%) | 9 (50%) | 9 (50%) | |
| 38-49 | 42 (28%) | 26 (62%) | 16 (38%) | |
| 50-69 | 73 (48%) | 44 (60%) | 29 (40%) | 0.8 |
| >70 | 11 (7 %) | 6 (54%) | 5 (45%) | |
| <u>Tipo histológico</u> | | | | |
| CDI | 129 (86%) | 73 (57%) | 56 (43%) | |
| CLI | 16 (10%) | 12 (75%) | 4 (25%) | 0.1 |
| Otros | 2 (1%) | 2 (100%) | 0 | |
| <u>Tamaño</u> | | | | |
| T1 | 59 (39%) | 32 (54%) | 27 (46%) | |
| T2 | 63 (42%) | 40 (63%) | 23 (36%) | 0.4 |
| T3-4 | 23 (15%) | 15 (65%) | 8 (35%) | |
| <u>Ganglios afectos</u> | | | | |
| N0 | 62 (41%) | 36 (58%) | 26 (42%) | |
| N1-3 | 47 (31%) | 30 (63%) | 17 (36%) | 0.6 |
| N4-9 | 18 (12%) | 9 (50%) | 9 (50%) | |
| N>=10 | 18 (12%) | 12 (67%) | 6 (33%) | |
| <u>Estadio</u> | | | | |
| I | 38 (26%) | 18 (47%) | 20 (53%) | |
| II | 72 (47%) | 45 (62%) | 27 (38%) | 0.2 |
| III | 37 (24%) | 24 (65%) | 13 (35%) | |
| <u>Grado histológico</u> | | | | |
| 1 | 14 (9%) | 9 (64%) | 5 (36%) | |
| 2 | 56 (37%) | 34 (61%) | 22 (39%) | 0.8 |
| 3 | 48 (32%) | 27 (56%) | 21 (43%) | |
| Desconocido | 34 (22%) | | | |
| <u>Receptores hormonales</u> | | | | |
| R. Estr (+) | 63 (41 %) | 40 (63%) | 23 (37%) | |
| R. Estr (-) | 31 (20%) | 18 (58%) | 13 (42%) | 0.3 |
| R. Prog (+) | 64 (42%) | 40 (62%) | 24 (38%) | |
| R.Prog (-) | 29 (19%) | 18 (62%) | 11 (38%) | |
| Desconocido | 58 (38%) | | | |
| <u>c-erbB2</u> | | | | |
| Positivo | 25 (16%) | 15 (60%) | 10 (40%) | 0.4 |
| Negativo | 35 (23%) | 19 (54%) | 16 (45%) | |
| Desconocido | 92 (60%) | | | |
| <u>Momento extracción</u> | | | | |
| Postcirugía | 132 (87%) | 78 (61%) | 49 (39%) | 0.06 |
| Precirugía | 20 (13%) | 8 (49%) | 12 (60%) | |

extracción fue prequirúrgica. Esta diferencia se aproxima a la significación estadística ($p=0.06$).

Con una mediana de seguimiento de las pacientes de este grupo de 11.7 meses (1-26), hemos observado 5 recaídas, una con recidiva local y cuatro con diseminación sistémica, de las cuales sólo 1 presentaba células tumorales ocultas en médula ósea (esta paciente ha recaído en hueso). Una paciente ha fallecido, en recaída, por una complicación relacionada con el tratamiento. Este número de eventos es insuficiente para realizar ninguna comparación estadística, que por otra parte está fuera de los objetivos de este estudio, si bien la pregunta queda abierta para posteriores análisis.

b) Respuesta a quimioterapia

112 pacientes aceptaron la práctica seriada de dos extracciones de médula ósea, antes y después del tratamiento quimioterápico neoadyuvante (13 pacientes, 12%) o adyuvante (99 pacientes, 88%). La distribución por estadios y factores pronósticos de este subgrupo no difiere significativamente de la descrita para el grupo completo.

La médula ósea fue positiva en 48/112 (43%) pacientes en la primera extracción y en 34/112 (30%) en la segunda, sin que la diferencia alcance significación estadística ($p=0.3$). Las figuras 14 y 15 muestran la frecuencia de positividad y las variaciones en la médula ósea antes y después de la quimioterapia. La figura 16 representa la monitorización del resultado en médula antes y después de la quimioterapia en cada paciente del grupo de tratamiento adyuvante.

De las 48 pacientes con médula ósea positiva al diagnóstico, 36 (75%) presentan resultado negativo en la segunda extracción y 12 (25%) mantienen el resultado positivo tras la quimioterapia, mientras que de las pacientes previamente negativas 22/54 (33%) positivizan la médula ósea y 42/54 (67%) continúan con médula ósea negativa. Podemos distinguir por tanto cuatro grupos de pacientes:

- Pacientes cuya médula permanece positiva: 12/112 (11%)
- Pacientes que negativizan la médula (de positiva a negativa): 36/112 (32%)
- Pacientes que positivizan la médula (de negativa a positiva): 22/112 (19%)
- Pacientes cuya médula permanece negativa: 42/112 (38%)

FIG. 13. Resultados en médula ósea según el momento de la extracción (antes o después de la cirugía) en las pacientes del grupo 1.

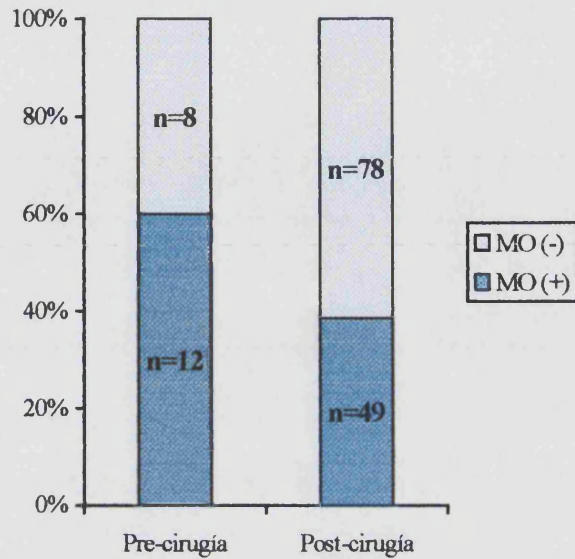


FIG. 14.- Contenido de células tumorales ocultas en la médula ósea antes y después de quimioterapia adyuvante.

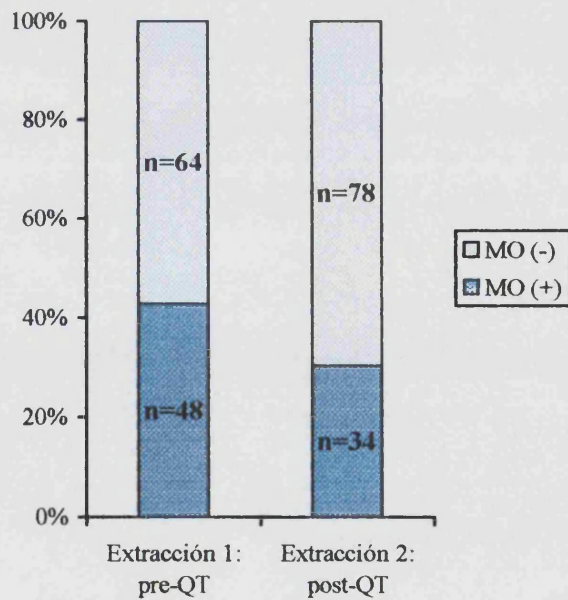
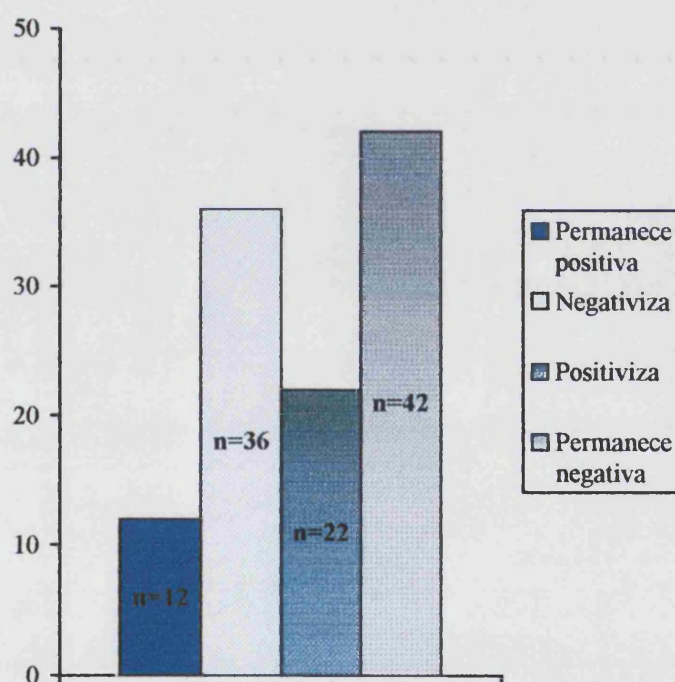


FIG. 15. Variación del contenido de células en médula ósea tras la administración de quimioterapia adyuvante. La tabla recoge los resultados de la primera (pre-QT) y segunda (post-QT) determinaciones. La figura divide a las pacientes en grupos según la variación en el resultado inicial.

| | MO 2 (-) | MO 2 (+) | Total |
|--------------|-----------------|-----------------|------------|
| MO 1 (-) | 42 (66%) | 22 (34%) | 64 (57%) |
| MO 1 (+) | 36 (75%) | 12 (25%) | 48 (43%) |
| Total | 78 (70%) | 34 (30%) | 112 |

MO 1: extracción pre-quimioterapia; MO 2: extracción postquimioterapia. (+): Médula positiva: >1 célula tumoral presentes. (-): Médula negativa: 0-1 célula tumoral presente



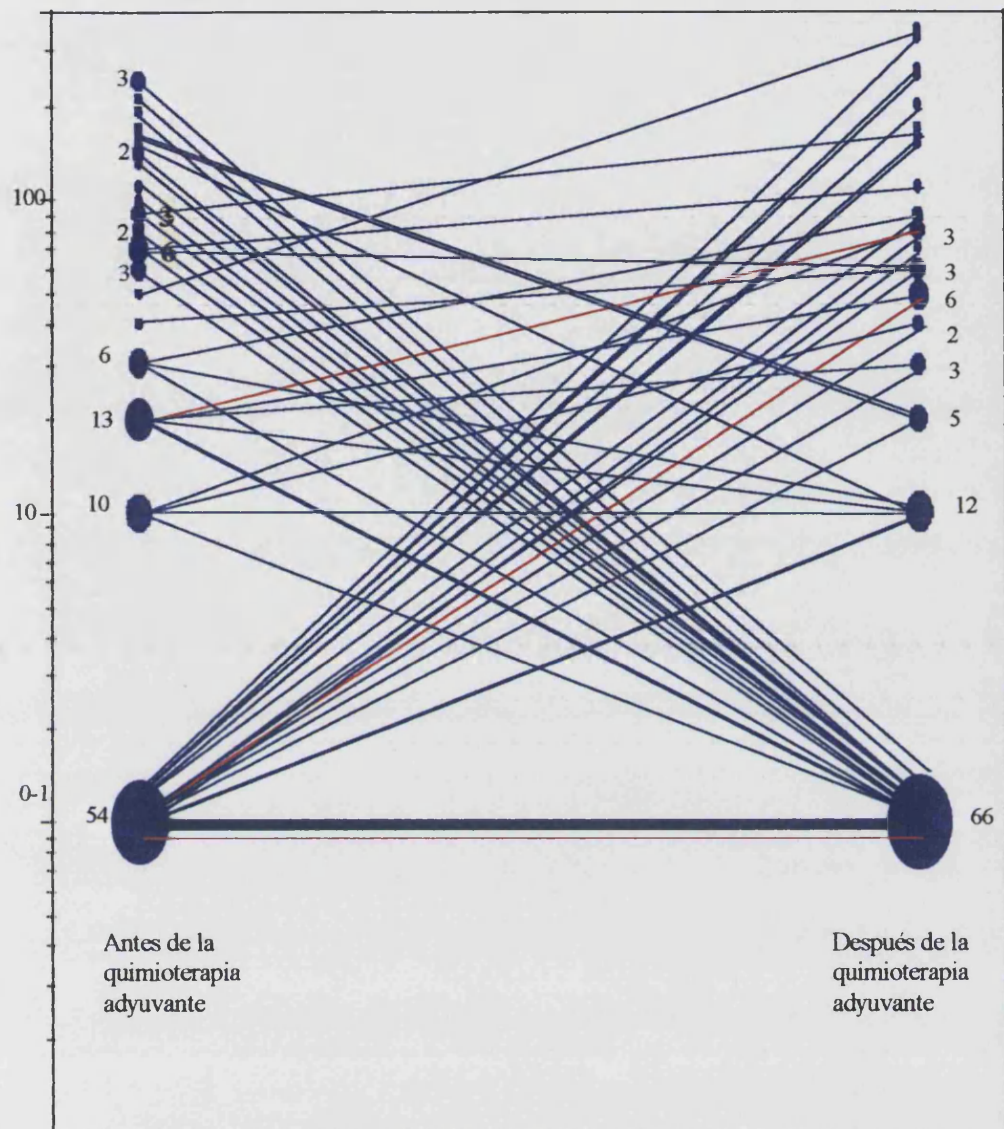


FIG. 16.- Monitorización de la respuesta de la médula ósea a quimioterapia en las pacientes de tratamiento adyuvante. Las líneas representan la trayectoria de la variación en el número de células citokeratina-positivas en cada paciente, y los ejes indican la situación antes (izquierdo) y después (derecho) del tratamiento. Los números junto a cada línea indican el número de pacientes con ese nivel de células en médula ósea. Las líneas rojas señalan las pacientes que han presentado progresión de la enfermedad. Se aprecia claramente como un porcentaje de pacientes con médula negativa pre-quimioterapia presentan un resultado positivo después.

Ningún factor pronóstico clásico parece influir significativamente en los resultados postquimioterapia (Tabla 10). La relación médula positiva antes/después se mantiene homogéneamente en 42/30 en prácticamente todas las categorías, aunque en las pacientes sin afectación ganglionar y en las que presentan grado histológico 1 puede adivinarse una mayor tendencia a negativizar la médula ósea tras la quimioterapia.

El tipo de quimioterapia administrada, combinaciones de antraciclinas sin taxanos (71 pacientes, 70%) ó con taxanos (31 pacientes, 30%), no influyó significativamente en el resultado positivo o negativo de la segunda extracción, aunque se aprecia una frecuencia algo menor de MO positiva post-quimioterapia cuando se han asociado taxanos (26% de positividad postquimioterapia con taxanos frente a 34% sin ellos).

TABLA 10.- Relación de los factores pronósticos con la detección de células tumorales ocultas en médula ósea pre y postquimioterapia en el grupo 1

| Pacientes con células tumorales ocultas en MO | | | | |
|---|-------|----------|----------|-----|
| Variables | Total | PRE-QT | POST- QT | p |
| <u>Todas las pacientes</u> | 112 | 48 (42%) | 34 (30%) | 0.3 |
| <u>Edad</u> | | | | |
| <=37 | 14 | 7 (50%) | 3 (21%) | 0.8 |
| 38-49 | 32 | 11 (34%) | 10 (31%) | |
| 50-69 | 56 | 25 (45%) | 17 (30%) | |
| >70 | 5 | 3 (60%) | 2 (40%) | |
| <u>Tipo histológico</u> | | | | |
| CDI | 98 | 44 (45%) | 31 (32%) | 0.5 |
| CLI | 13 | 4 (31%) | 3 (23%) | |
| <u>Tamaño</u> | | | | |
| T1 | 47 | 23 (49%) | 18 (38%) | 0.3 |
| T2 | 50 | 18 (36%) | 14 (28%) | |
| T3-4 | 12 | 5 (42%) | 2 (16%) | |
| <u>Ganglios afectos</u> | | | | |
| N0 | 52 | 23 (44%) | 15 (28%) | 0.6 |
| N1-3 | 34 | 14 (41%) | 12 (35%) | |
| N4-9 | 11 | 6 (54%) | 2 (18%) | |
| N>=10 | 13 | 4 (30%) | 5 (38%) | |
| <u>Estadio</u> | | | | |
| I | 34 | 18 (53%) | 10 (30%) | 0.7 |
| II | 53 | 21 (40%) | 18 (34%) | |
| III | 23 | 8 (35%) | 6 (26%) | |
| <u>Grado histológico</u> | | | | |
| 1 | 10 | 5 (50%) | 2 (20%) | 0.5 |
| 2 | 45 | 17 (38%) | 13 (29%) | |
| 3 | 46 | 16 (45%) | 13 (36%) | |
| <u>Receptores hormonales</u> | | | | |
| R. Estr (+) | 48 | 18 (37%) | 14 (29%) | 0.7 |
| R. Estr (-) | 20 | 10 (50%) | 5 (25%) | |
| R. Prog (+) | 50 | 19 (38%) | 14 (28%) | |
| R.Prog (-) | 17 | 8 (47%) | 5 (30%) | |
| <u>c-erbB2</u> | | | | |
| Positivo | 15 | 6 (40%) | 3 (20%) | 0.9 |
| Negativo | 26 | 13 (50%) | 6 (23%) | |
| Desconocido | | | | |
| <u>Tipo de quimioterapia</u> | | | | |
| Antraciclinas (comb) | 76 | 33 (43%) | 26 (34%) | 0.4 |
| Antrac + Taxano | 33 | 15 (45%) | 8 (24%) | |
| <u>Momento extracción</u> | | | | |
| Postcirugía | 98 | 40 (40%) | 26 (34%) | 0.5 |
| Precirugía | 13 | 8 (62%) | 8 (24%) | |

IV. 1. 2. Pacientes con enfermedad metastásica (grupo 2)

a) Frecuencia de detección de células tumorales aisladas en médula ósea

28/43 (65%) pacientes presentaron células citoqueratina positivas en la médula ósea en la primera extracción (Fig. 12). La mediana de células tumorales en las pacientes con médula ósea positiva fue 11 cel/2 x 10⁶ (2-1500).

No se encontró relación estadísticamente significativa entre la presencia de células tumorales ocultas en médula ósea, en mayor o menor número, y los factores pronósticos clásicos que presentaron las pacientes en el momento del diagnóstico de cáncer de mama (tabla 11), ni tampoco con otros factores en la recaída como la mediana de tiempo hasta la progresión o el volumen tumoral, representado por el número de localizaciones de metástasis (tabla 12).

El estudio citomorfológico del aspirado medular fue negativo en todas las pacientes, pero la observación microscópica convencional de la biopsia bilateral de médula ósea mostró metástasis en 11 pacientes, de las cuales no se sospechaba esta localización. En la mayoría de ellas las células se agrupaban en racimos entre los componentes normales de la médula, como es habitual (Fig.17). Lógicamente en estas pacientes la visión inmunocitoquímica de la médula resultó espectacular (Fig. 18), al poner de manifiesto células aisladas no identificables con la simple visión microscópica.

b) Respuesta a quimioterapia

Se realizó estudio de médula ósea pre y postquimioterapia para la enfermedad metastásica a 25 pacientes que aceptaron la 2ª extracción. No hay diferencias significativas entre las características de estas pacientes y las de las 43 que acabamos de describir, excepto en el tamaño tumoral y estadio: en las pacientes que tienen dos extracciones hay mayor número de pacientes con tamaño T3-4 y con estadio III y IV.

La médula ósea fue positiva en 19/25 (73%) pacientes en la primera extracción y en 6/25 (24%) en la segunda. La diferencia, aunque es llamativa, no alcanza significación estadística (p=0.1).

FIG. 17.- Metástasis en médula ósea visibles al microscopio con la tinción convencional. Las células son de gran tamaño, con núcleo grande y relación núcleo-citoplasma disminuida, y se presentan habitualmente en grupos o racimos (Fotografía superior: 400x; inferior: 1250x).

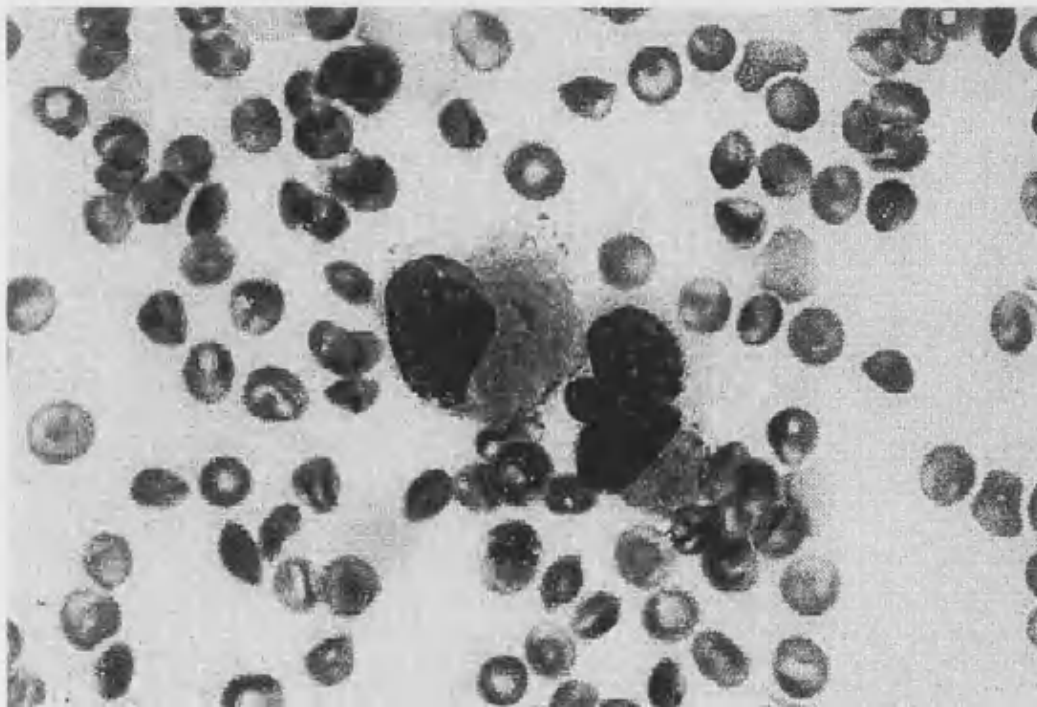
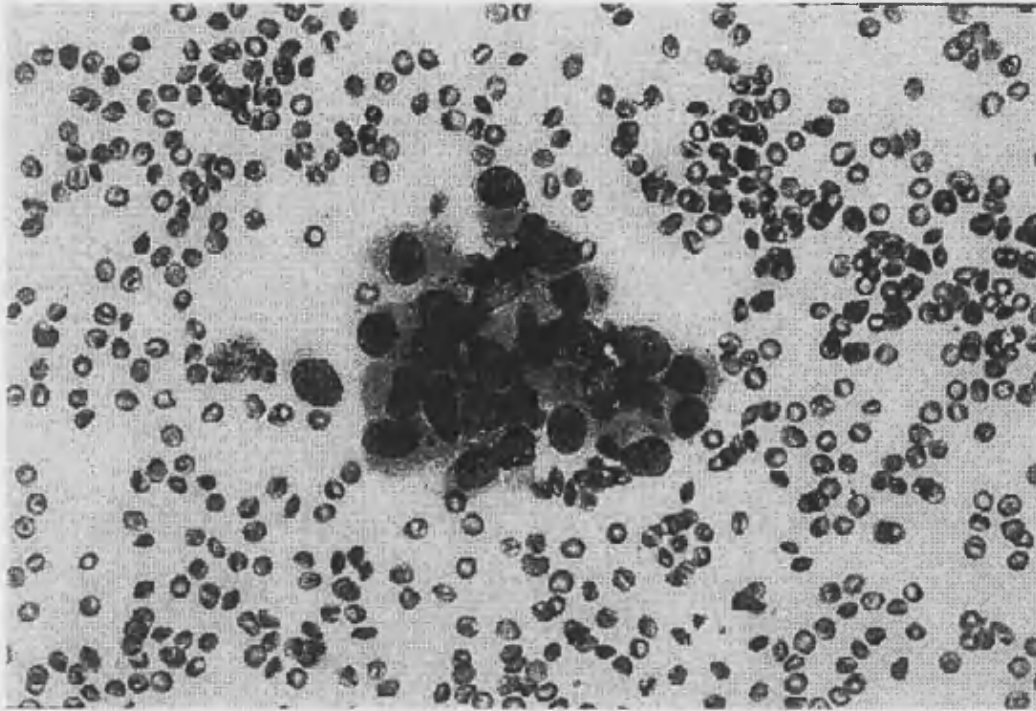
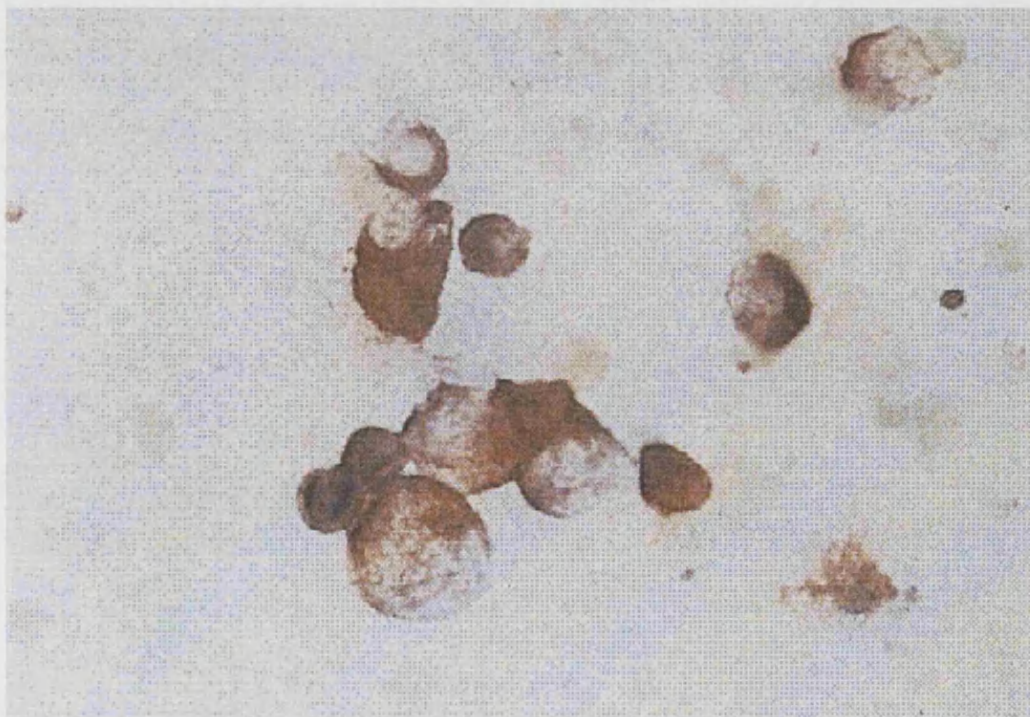
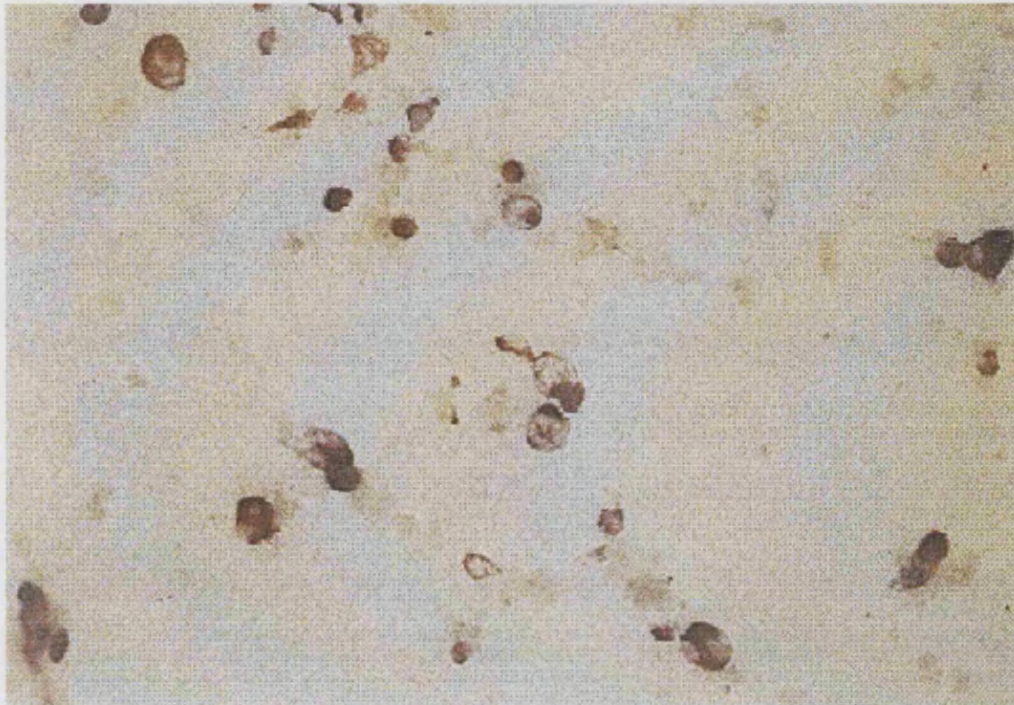


FIG. 18.- Imagen que presenta la médula ósea de la fotografía anterior con la tinción inmunocitoquímica anti-citoqueratinas. (Fotografía superior: 200x; inferior: 1250x)



Las figuras 19 y 20 muestran la variación en los resultados en la médula ósea antes y después del tratamiento. Tras la quimioterapia se negativizó la médula ósea de 13 (68%) de las 19 pacientes con positividad inicial, y no se observó ninguna positivización entre las 6 previamente negativas. Permaneció positiva la médula en 6/19 (32%) pacientes. No se pudo demostrar relación significativa entre la variación en la médula ósea y ningún factor pronóstico clásico, al diagnóstico ni en la recaída, como resume la tabla 14. Como en el grupo 1, podemos distinguir cuatro subgrupos de pacientes:

- permanece positiva: 6/25 (24% del total de pacientes)
- negativización (de positiva a negativa): 13/25 (52%)
- positivización (de negativa a positiva): 0/25
- permanece negativa: 6/25 (24%)

El número mediano de células en médula ósea también se redujo casi en un 50% en la segunda determinación, en relación con la primera: de 16 (3-1500) pasó a 8.5 (2-807) células: 2×10^6

El tipo de quimioterapia aplicada (taxanos versus combinaciones de antraciclinas sin taxanos versus ambos) no influyó significativamente en la respuesta de la médula ósea al tratamiento. Si bien los resultados muestran mayor negativización medular en las pacientes que recibieron taxanos (17/21 - 81%- se negativizan, mientras que las dos pacientes con médula positiva que reciben combinaciones de antraciclinas sin taxanos permanecen igual tras el tratamiento), los números no permiten establecer comparaciones ni el diseño del estudio lo pretende.

c) Relación con las distintas localizaciones de metástasis

Se detectaron células citoqueratina positivas en la médula ósea de 28/40 (70%) pacientes con recaída sistémica. Ninguna de las dos pacientes con recaída local presentaba células tumorales ocultas en médula ósea.

17/23 (74%) pacientes con más de una localización de metástasis presentaron positividad medular inmunocitoquímica, frente a 11/18 (58%) pacientes con un único sitio de recaída, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas (fig. 21). Se apreció una frecuencia algo mayor de inmunopositividad en la médula ósea en las pacientes con recaída ósea y visceral: 15/20 (72%) con recaída ósea y 18/25 (75%) pacientes con recaída

visceral presentaron médula ósea positiva, frente a 8/15 (53%) pacientes con recaída ganglionar. El número de pacientes no fue suficiente para demostrar diferencias estadísticamente significativas.

Todas las pacientes con metástasis en médula ósea visibles al microscopio convencional presentaron inmunocitoquímica positiva. De las 11 pacientes con metástasis 19/31 (57%) pacientes con médula ósea negativa por método convencional mostraron afectación medular inmunocitoquímica. El porcentaje es algo inferior al del grupo global aunque la diferencia no tiene significación estadística. La distribución de metástasis en este subgrupo es igual a la del grupo global.

d) Relación de la respuesta a quimioterapia con la respuesta clínica

En las pacientes metastásicas la respuesta a quimioterapia se evaluó tras 3-4 ciclos o tras 8-12 semanas de tratamiento, mediante las exploraciones clínicas y de imagen necesarias, siguiendo los criterios de respuesta de la OMS. En el momento de la evaluación se realizó la segunda extracción de médula ósea a las 25 pacientes que lo aceptaron.

7/25 (28%) pacientes presentaron respuesta completa al tratamiento, con desaparición total de las lesiones visibles y normalización de marcadores tumorales si los tenían elevados. 9/25 (36%) pacientes presentaron respuesta parcial y 7/25 (28%) mostraron estabilización de la enfermedad, o ausencia de progresión si se encontraban en situación NED (ausencia de enfermedad evidente tras cirugía de la lesión). Ninguna paciente presentó progresión de la enfermedad antes de 6 meses desde el inicio del tratamiento. Dentro de los distintos subgrupos de respuesta las localizaciones de recaída se distribuyen homogéneamente, excepto la localización ósea, en la que como es lógico no puede valorarse una respuesta completa.

La respuesta medular no se correlacionó con la respuesta en las otras localizaciones: como muestra la figura 22, de las 6 pacientes con respuesta completa y médula previamente positiva pudimos apreciar negativización inmunocitoquímica de la médula ósea en 3 y persistencia de células positivas en otras 3, mientras que 6 de las 7 con respuesta parcial y 4 de las 5 con enfermedad estable negativizaron la médula ósea, que permaneció positiva sólo en 1 paciente de cada grupo.

e) Relación entre la situación inmunocitoquímica medular y la evolución de la enfermedad.

La mediana de seguimiento de las 42 pacientes de este grupo desde la recaída es de 10.7 meses (2.4 – 41), durante los cuales 16 pacientes presentaron progresión de la enfermedad. Las localizaciones de progresión son, en la mayoría de las pacientes, las mismas que las de la primera recaída, aunque en cuatro de ellas hay nuevos sitios de metástasis (ovario, sistema nervioso, pulmón, hígado).. Se han registrado hasta el momento 4 muertes, todas en relación con la enfermedad.

Con una mediana de seguimiento de 10.7 meses han progresado 5/14 (35%) pacientes con médula ósea negativa frente a 11/28 (39.2%) con médula ósea inmunocitoquímicamente positiva, sin que la diferencia sea estadísticamente significativa (tabla 13), y han fallecido 1/14 (7.1%) pacientes con médula negativa frente a 3/28 (10.7%) pacientes con médula positiva. Tanto el tiempo de seguimiento como el número de eventos es insuficiente para establecer diferencias significativas en el análisis de supervivencia, que tampoco entra en los objetivos del presente trabajo, si bien la pregunta queda abierta para posteriores investigaciones. Únicamente con intención descriptiva se reseña la evolución de las pacientes en relación con el estado de la médula ósea en el momento del diagnóstico de la recaída

De las 25 pacientes con dos extracciones de médula ósea, han progresado 7/19 (37%) inicialmente “positivas” y 1/6 (16%) inicialmente negativas. En relación con la extracción postquimioterapia, es interesante destacar que 3/6 (50%) pacientes con médula positiva en la 2ª extracción han progresado, frente a 5/19 (26%) de las que presentaron médula negativa (Fig. 23). Tampoco aquí las diferencias son significativas, por el escaso número de eventos registrado.

TABLA 12.- Relación entre detección de células tumorales ocultas en médula ósea y factores pronósticos en la recaída en las pacientes del grupo 2.

| Factor | Total | MO negativa (%) | MO positiva (%) | p |
|---|--------------------|-----------------|-----------------|-----|
| <u>Todas las pacientes</u> | 42 | 14 (35%) | 28 (65%) | |
| <u>Tiempo a la progresión</u> (desde el diagnóstico) | 31.3 meses (0-116) | 26.7 | 35.1 | 0.2 |
| <u>Sitio de recaída</u> | | | | |
| Local | 2 (5%) | 2 (100%) | - | 0.1 |
| Sistémica | 40 (95) | 12 (30%) | 28 (70%) | |
| Osea | 25 (58%) | 7 (28%) | 18 (72%) | 0.3 |
| Ganglionar | 15 (35%) | 7 (46%) | 8 (53%) | 0.1 |
| Visceral | 20 (46%) | 5 (25%) | 15 (75%) | 0.2 |
| <u>Nº localizaciones M+</u> | | | | |
| 1 | 16 (37%) | 5 (31%) | 11 (68%) | 0.9 |
| 2 | 18 (42%) | 6 (33%) | 12 (66%) | |
| 3-4 | 8 (19%) | 3 (37%) | 5 (62%) | |

(*) TASPE: Quimioterapia a dosis altas y trasplante autólogo de sangre periférica.

M+: metástasis

TABLA 13. Frecuencia de progresión de enfermedad y muerte por enfermedad en las pacientes metastásicas, en relación con el resultado en médula ósea (mediana de seguimiento 10.7 meses)*

| | Total (n=42) | MO negativa | MO positiva | p |
|-------------------|--------------|-------------|-------------|-----|
| <u>PROGRESION</u> | 16 (38%) | 6 (37%) | 10 (62%) | 0.3 |
| <u>EXITUS</u> | 4 (9%) | 1 (25%) | 3 (75%) | NS |

* Estos resultados son puramente descriptivos, el seguimiento y el número de eventos no son suficientes para obtener conclusiones (ver texto).

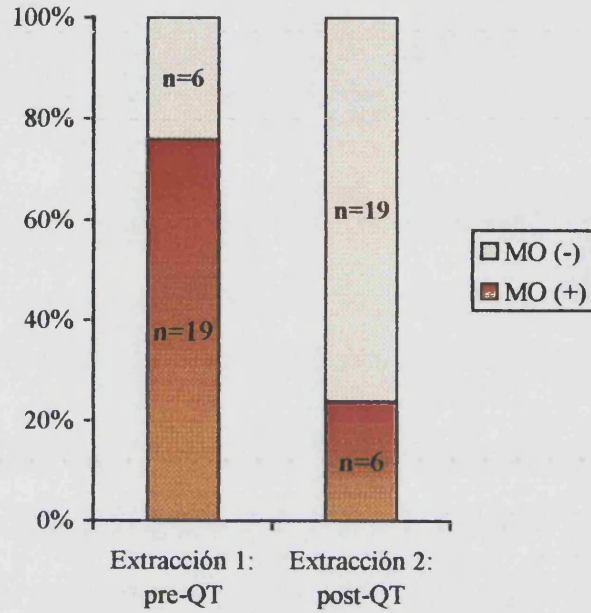
TABLA 11.- Relación entre la detección de células tumorales ocultas en médula ósea y factores pronósticos (al diagnóstico inicial) en las pacientes del grupo 2.

| Factor | Total | MO negativa (%) | MO positiva (%) | p |
|------------------------------|------------|-----------------|-----------------|------|
| <u>Todas las pacientes</u> | 42 | 14 (35%) | 28 (65%) | - |
| <u>Edad mediana (rango)</u> | 46 (33-67) | 48 (36-67) | 40 (33-61) | |
| <=37 | 6 (14%) | 1 (16%) | 5 (83%) | 0.7 |
| 38-49 | 19 (44%) | 6 (31%) | 13 (68%) | |
| 50-69 | 13 (30%) | 4 (30%) | 9 (70%) | |
| >70 | - | - | - | |
| <u>Tipo histológico</u> | | | | |
| CDI | 33 (77%) | 12 (36%) | 21 (64%) | 0.8 |
| CLI | 5 (12%) | 2 (40%) | 3 (60%) | |
| <u>Tamaño</u> | | | | |
| T1 | 8 (19%) | 1 (13%) | 7 (87%) | |
| T2 | 5 (42%) | 8 (44%) | 10 (55%) | 0.2 |
| T3-4 | 10 (23%) | 5 (50%) | 5 (50%) | |
| <u>Ganglios afectos</u> | | | | |
| N0 | 11 (26%) | 3 (27%) | 8 (73%) | |
| N1-3 | 14 (33%) | 5 (36%) | 9 (64%) | 0.6 |
| N4-9 | 6 (14%) | 2 (33%) | 9 (50%) | |
| N>=10 | 5 (11%) | 3 (60%) | 6 (33%) | |
| <u>Estadio</u> | | | | |
| I | 4 (10%) | - | 4 (100%) | |
| II | 20 (47%) | 8 (40%) | 12 (60%) | 0.4 |
| III | 10 (23%) | 4 (40%) | 6 (60%) | |
| IV | 6 (14%) | 2 (33%) | 4 (67%) | |
| <u>Grado histológico</u> | | | | |
| 1 | 3 (7%) | 1 (33%) | 2 (66%) | |
| 2 | 14 (34%) | 4 (28%) | 10 (71%) | 0.5 |
| 3 | 8 (18%) | 4 (50%) | 4 (50%) | |
| Desconocido | 18 (41%) | | | |
| <u>Receptores hormonales</u> | | | | |
| R. Estr (+) | 21 (49%) | 4 (19%) | 17 (81%) | |
| R. Estr (-) | 9 (21%) | 5 (56%) | 4 (44%) | 0.08 |
| R. Prog (+) | 17 (40%) | 3 (17%) | 14 (83%) | |
| R. Prog (-) | 13 (30%) | 6 (46%) | 7 (54%) | |
| Desconocido | 13 (30%) | | | |
| <u>c-erbB2</u> | | | | |
| Positivo | 8 (19%) | 4 (50%) | 4 (50%) | 0.2 |
| Negativo | 14 (32%) | 4 (28%) | 10 (72%) | |
| Desconocido | 21 (48%) | | | |

TABLA 14.- Frecuencia de positividad medular antes y después de la quimioterapia para la enfermedad metastásica en relación con las características de las pacientes

| Variables | Pacientes con células tumorales ocultas en MO (MO+) | | | |
|-----------------------------------|---|-----------|----------|-----|
| | Total | PRE-QT | POST- QT | P |
| <u>Todas las pacientes</u> | 25 | 19 (76%) | 6 (24%) | 0.1 |
| <u>Edad</u> | | | | |
| <=37 | 4 | 4 (100%) | 2 (50%) | |
| 38-49 | 12 | 10 (83%) | 3 (25%) | 0.3 |
| 50-69 | 8 | 5 (62%) | 1 (12%) | |
| <u>Tipo histológico</u> | | | | |
| CDI | 20 | 14 (74%) | 4 (50%) | 0.2 |
| CLI | 4 | 3 (75%) | 2 (50%) | |
| <u>Tamaño</u> | | | | |
| T1 | 6 | 6 (100%) | 1 (17%) | |
| T2 | 7 | 5 (71%) | 2 (29%) | 0.7 |
| T3-4 | 9 | 4 (50%) | 1 (12%) | |
| <u>Ganglios afectos</u> | | | | |
| N0 | 7 | 5 (83%) | 2 (33%) | |
| N1-3 | 9 | 7 (78%) | 2 (22%) | 0.9 |
| N4-9 | 3 | 2 (67%) | 1 (33%) | |
| N>=10 | 3 | 2 (50%) | 1 (25%) | |
| <u>Estadio</u> | | | | |
| I | 4 | 5 (83%) | 1 (25%) | |
| II | 9 | 7 (78%) | 3 (37%) | 0.7 |
| III | 8 | 2 (67%) | 1 (12%) | |
| IV | 5 | 2 (50%) | 1 (25%) | |
| <u>Grado histológico</u> | | | | |
| 1 | 2 | 1 (50%) | 0 | |
| 2 | 13 | 9 (75%) | 2 (17%) | 0.6 |
| 3 | 3 | 3 (100%) | 0 | |
| <u>Receptores hormonales</u> | | | | |
| R. Estr (+) | 15 | 13 (87%) | 5 (33%) | |
| R. Estr (-) | 5 | 2 (40%) | 1 (20%) | 1 |
| R. Prog (+) | 12 | 11 (92%) | 4 (33%) | |
| R.Prog (-) | 8 | 4 (50%) | 2 (25%) | |
| <u>Localización de la recaída</u> | | | | |
| Osea | 14 | 11 (78%) | 3 (22%) | |
| Ganglionar | 9 | 5 (55%) | 2 (22%) | 0.1 |
| Visceral | 10 | 8 (80%) | 1 (10%) | |
| Médula ósea | 7 | 7 (100) | 4 (67%) | |
| <u>Tratamiento administrado</u> | | | | |
| Antraciclina (comb) | 4 | 2 (50%) | 2 (50%) | |
| Antrac + Taxanos | 6 | 5 (100%) | 1 (20%) | 0.4 |
| Sólo Taxanos | 15 | 11 (73%) | 3 (20%) | |

FIG. 19.- Variaciones en el número de células tumorales ocultas en médula ósea antes y después de la quimioterapia en las pacientes metastásicas: La figura superior representa la frecuencia de positividad y negatividad, que está resumida en la tabla. La figura inferior divide a las pacientes en grupos según la respuesta a quimioterapia



| | MO2 (-) | MO2 (+) | Total |
|--------------|-----------------|----------------|-----------|
| MO1 (-) | 6 (100%) | 0 | 6 (24%) |
| MO1 (+) | 13 (68%) | 6 (32%) | 19 (76%) |
| Total | 19 (76%) | 6 (24%) | 25 |

MO 1: extracción pre-quimioterapia; MO 2: extracción postquimioterapia. (+): Médula positiva: >1 célula tumoral presentes. (-): Médula negativa: 0-1 célula tumoral presente

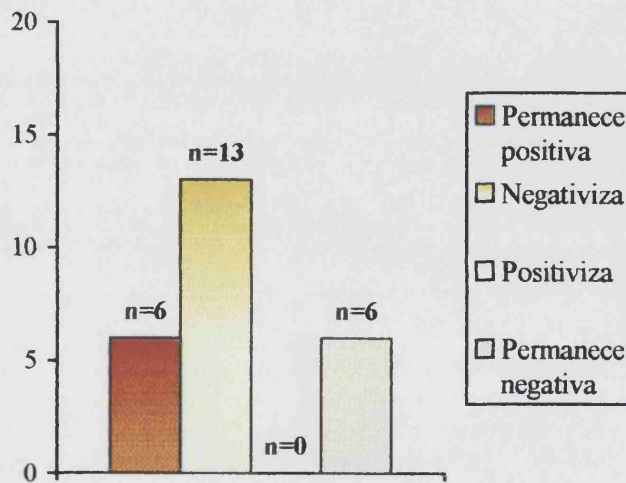


FIG. 21.- Relación de la presencia de células tumorales ocultas en médula ósea con los diferentes sitios de metástasis y el número total de localizaciones en las pacientes del grupo 2 (n=43 pacientes).

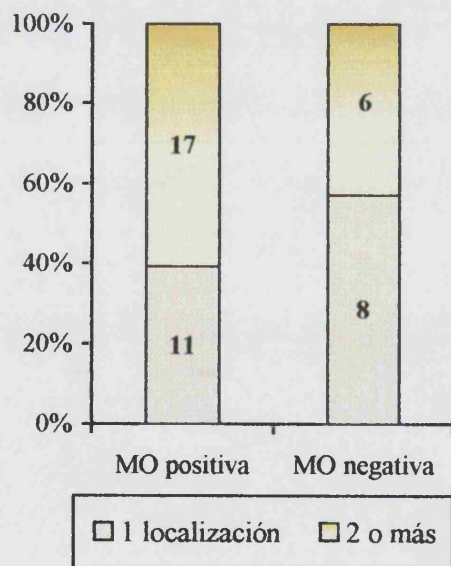
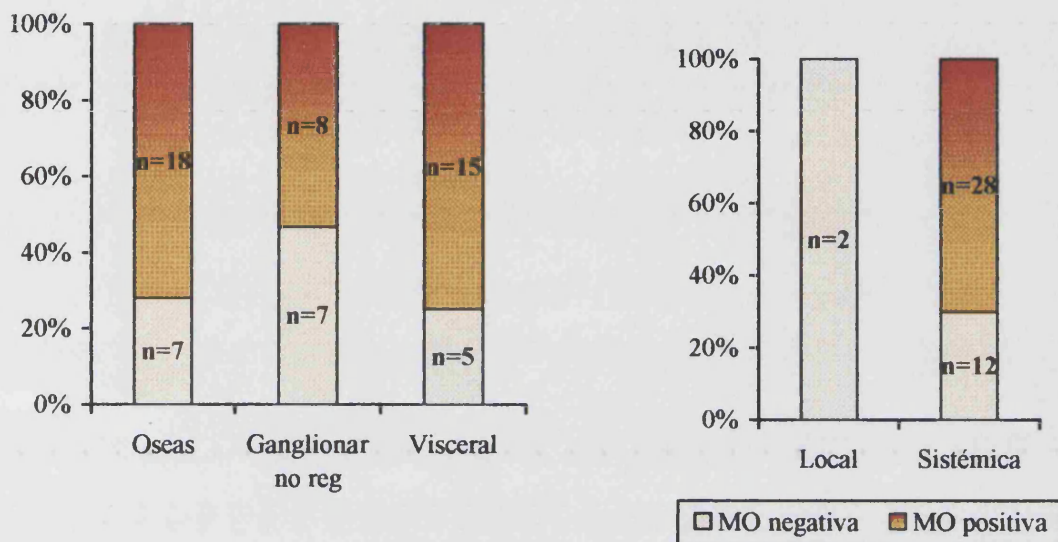
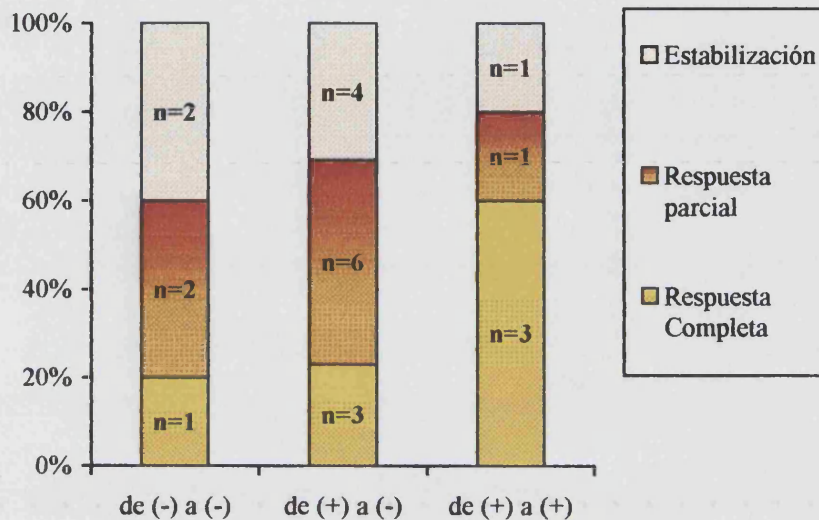
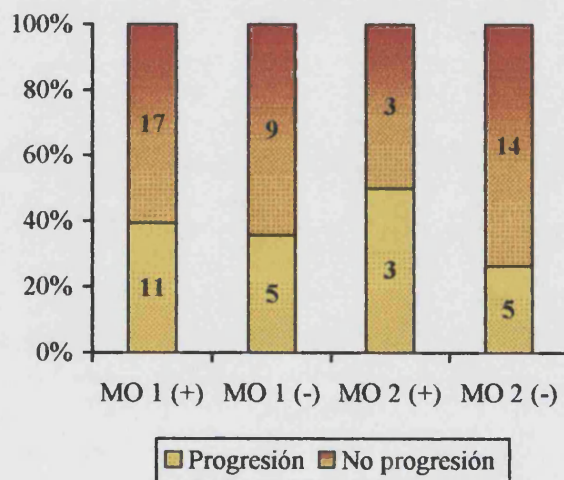


FIG. 22.- Relación entre respuesta medular y respuesta de la enfermedad diseminada a quimioterapia. La primera columna representa las pacientes cuya médula permanece negativa tras el tratamiento; la segunda, las que negativizan la médula, y la tercera las que permanecen con médula positiva. El número de células citoqueratina-positivas en médula ósea se redujo a más de la mitad en casi todas las pacientes.



| | De (-) a (-) | De (+) a (-) | De (+) a (+) | Total |
|-------------------|--------------|--------------|--------------|-------|
| R Completa | 1 (14%) | 3 (42%) | 3 (42%) | 7 |
| R Parcial | 2 (22%) | 6 (66%) | 1 (11%) | 9 |
| E Estable | 2 (29%) | 4 (57%) | 1 (14%) | 6 |
| Total | 5 | 13 | 4 | 22 |

FIG. 23.- Frecuencia de progresión de la enfermedad según el estado de la médula ósea antes (MO 1) y después (MO 2) de la quimioterapia



IV. 2. OBJETIVOS SECUNDARIOS:

IV. 2. 1. Pacientes con marcadores tumorales elevados (grupo 3)

a) Frecuencia de detección de células tumorales aisladas en médula ósea

15/25 (60%) pacientes con marcadores tumorales elevados y sin otra evidencia de enfermedad metastásica presentaron células tumorales ocultas en el aspirado de médula ósea (Fig. 12). La observación microscópica simple de las muestras de biopsia de cresta ilíaca no apreció metástasis en ninguna paciente. El número mediano de células fue de 7 células/ 2×10^6 (2-291)

Igual que en los grupos 1 y 2, no se encontró asociación estadística entre la positividad o negatividad en médula y los diferentes factores pronósticos clásicos de la enfermedad en el momento del diagnóstico inicial (tipo histológico, tamaño tumoral, afectación ganglio, estadio, grado histológico del tumor y expresión de receptores hormonales), como se puede observar en la tabla 15. Si bien el número de pacientes es escaso en los diferentes subgrupos, no se aprecia ninguna tendencia hacia mayor positividad en las categorías consideradas de peor pronóstico.

b) Relación entre la situación inmunocitoquímica medular y la evolución de la enfermedad (tabla 16)

Con una mediana de seguimiento de 14 meses (1-34), se ha constatado progresión de la enfermedad en 12/25 (44%) pacientes, de las cuales 9 (75%) tenían células tumorales ocultas en la médula ósea, mientras que 3 (25%) presentaban la médula negativa en el momento de la elevación del marcador CA 15.3.

9/15 (60%) pacientes con médula ósea inmunocitoquímicamente positiva han progresado, frente a 3/10 (30%) pacientes con médula negativa. Esta diferencia, como en el grupo anterior, no alcanza significación estadística; las progresiones, sin embargo, tienden a acumularse en el grupo de médula positiva, lo cual permite intuir un resultado más concluyente con un seguimiento y número de pacientes mayor.

Todas las localizaciones de recaída son sistémicas: 8 pacientes han presentado una sola localización, 3 presentaron 2 y 1 recayó en 3 localizaciones,

sin que hayamos apreciado relación entre la positividad medular y el volumen tumoral representado por el número de sitios de metástasis. 5/12 (45%) pacientes en recaída tienen metástasis óseas, 6/12 (50) presentan metástasis viscerales y en 1/12 (8%) la recaída es ganglionar. Todas las pacientes (100%) que han presentado recaída visceral (pulmonar, hígado, ovario) tenían células tumorales ocultas en médula ósea, mientras que sólo la mitad de las pacientes con recaída ósea o ganglionar presentaban médula ósea positiva (figura 26).

Con respecto a la supervivencia, han fallecido 3 pacientes (12%) de este grupo, todas por la enfermedad neoplásica, 2 de las cuales presentaron médula ósea positiva. No es posible realizar ningún análisis de supervivencia fiable con tan escasos eventos, cuestión que queda pendiente para un estudio posterior.

IV. 2.2. Relación sangre periférica- médula ósea

Se realizaron 60 extracciones de sangre periférica correspondientes a 47 pacientes, el mismo día de la extracción de médula ósea.

La sangre periférica fue positiva en 3/60 (5%) determinaciones y negativa en todas las demás. Las tres muestras pertenecían a distintas pacientes. La médula ósea fue positiva sin embargo en 26/60 (43%) determinaciones, con una mediana de 7 células/ 2×10^6 (2-807). Las tres muestras de sangre periférica positivas correspondían a médula ósea también positiva. Las 3 presentaban más de 5 células inmunocitoquímicamente positivas en la médula ósea. El número de células en sangre periférica fue menor (50%) que el número en médula ósea. Ninguna paciente con médula ósea negativa presentó células tumorales circulantes en sangre periférica.

En dos de las 60 muestras de médula ósea se detectaron metástasis en el estudio convencional al microscopio óptico. La sangre periférica correspondiente fue negativa, a pesar de un número de células tumorales elevado en médula ósea (807 y 17 células/ 2×10^6).

Por tanto la correlación entre detección de células tumorales ocultas en médula ósea y en sangre periférica es de un 11% con el procedimiento utilizado.

TABLA 15.- Relación entre la presencia o ausencia de células tumorales ocultas en médula ósea y los factores pronósticos clásicos en el grupo 3.

| Factor | MO negativa (%) | MO positiva (%) | p |
|------------------------------|-----------------|-----------------|-----|
| <u>Todas las pacientes</u> | 10 (40%) | 15 (60%) | - |
| <u>Edad mediana (rango)</u> | | | |
| <=37 | 1 (33%) | 2 (77%) | 0.4 |
| 38-49 | 2 (29%) | 5 (71%) | |
| 50-69 | 5 (56%) | 4 (44%) | |
| >70 | 0 | 2 (100%) | |
| <u>Tipo histológico</u> | | | |
| CDI | 8 (40%) | 12 (60%) | 0.4 |
| CLI | 0 | 1 (100%) | |
| <u>Tamaño</u> | | | |
| T1 | 1 (20%) | 4 (80%) | 0.7 |
| T2 | 4 (40%) | 6 (60%) | |
| T3-4 | 2 (40%) | 3 (60%) | |
| <u>Ganglios afectos</u> | | | |
| N0 | 3 (37%) | 5 (62%) | 0.6 |
| N1-3 | 0 | 4 (100%) | |
| N4-9 | 3 (50%) | 3 (50%) | |
| N>=10 | 2 (67%) | 1 (33%) | |
| <u>Estadio</u> | | | |
| I | 1 (25%) | 3 (75%) | 0.4 |
| II | 3 (33%) | 6 (66%) | |
| III | 4 (57%) | 3 (43%) | |
| IV | 1 (50%) | 1 (50%) | |
| <u>Grado histológico</u> | | | |
| 1 | 0 | 2 (100%) | 0.4 |
| 2 | 5 (50%) | 5 (50%) | |
| 3 | 1 (33%) | 2 (67%) | |
| <u>Receptores hormonales</u> | | | |
| R. Estr (+) | 2 (33%) | 2 (66%) | 0.3 |
| R. Estr (-) | 3 (60%) | 4 (40%) | |
| R. Prog (+) | 2 (33%) | 2 (66%) | |
| R. Prog (-) | 3 (60%) | 4 (40%) | |

TABLA 16.- Relación entre la presencia o ausencia de células tumorales ocultas en médula ósea y las características en la progresión en las pacientes con marcadores tumorales séricos elevados (grupo 3, mediana de seguimiento=14 meses)

| Factor | Total | MO negativa (%) | MO positiva (%) | p |
|--|------------|-----------------|-----------------|------|
| <u>Todas las pacientes</u> | 25 | 10 (40%) | 15 (60%) | 0.4 |
| <u>Progresión</u> | 12 (48%) | 3 (25%) | 9 (75%) | 0.2 |
| <u>Tiempo progresión</u> (mediana, rango) | 7.1 (1-32) | 11.5 (1-32) | 6.8 (2-25) | 0.2 |
| <u>Nº localizaciones</u> | | | | |
| 1 | 8 (66%) | 2 (25%) | 6 (75%) | 0.6 |
| ≥2 | 4 (34%) | 1 (35%) | 3 (75%) | |
| <u>Sitios de recaída</u> | | | | |
| Hueso | 5 (41%) | 3 (60%) | 2 (40%) | 0.06 |
| Visceral | 6 (50%) | 0 | 6 (100%) | |
| Ganglionar | 1 (8%) | 0 | 1 (100%) | |
| <u>Exitus</u> | 3 (12%) | 1 (33%) | 2 (66%) | - |

FIG. 25.- Relación de la presencia de células tumorales ocultas en médula ósea con las diferentes localizaciones de metástasis en la recaída, en las pacientes con marcadores tumorales elevados (n= 25, n° recaídas= 12). Obsérvese cómo todas las recaídas viscerales tienen lugar en las pacientes con médula ósea positiva y sin embargo más de la mitad de las recaídas óseas aparecen en pacientes sin afectación medular.

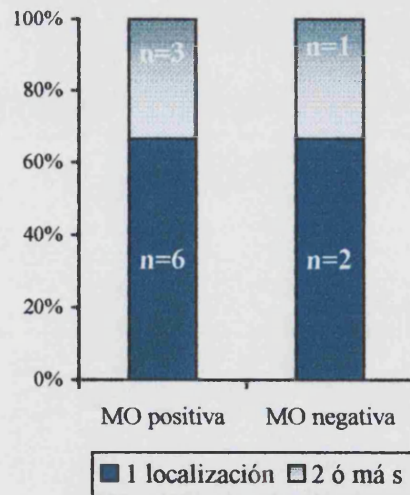
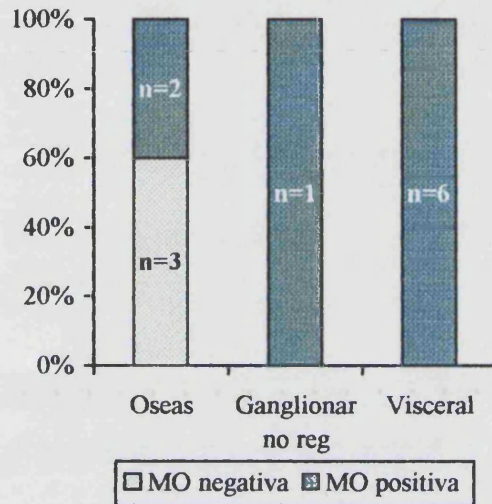
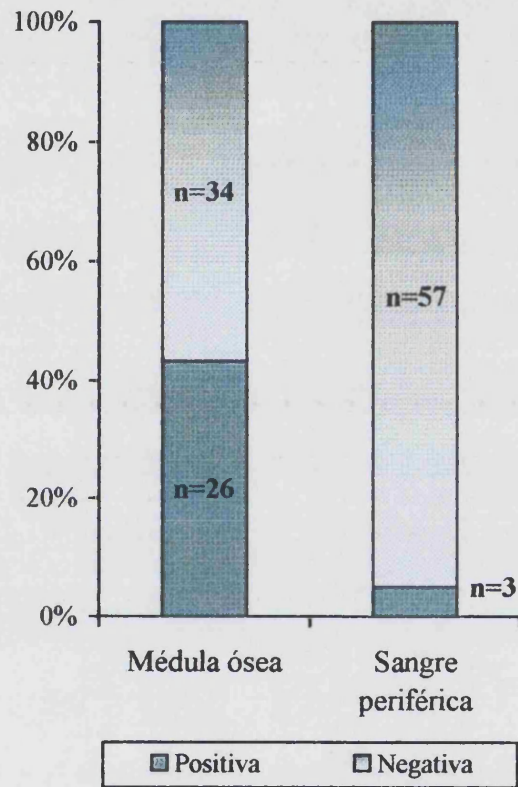


FIG. 26.- Correlación entre la detección de células tumorales en médula ósea y sangre periférica



V. DISCUSIÓN

El objetivo principal del presente estudio fue evaluar la respuesta a quimioterapia de las células tumorales ocultas en médula ósea en pacientes con cáncer de mama, con el fin de abrir un campo para futuros estudios prospectivos de intervención, casi inexistentes hasta ahora. Incluimos para este objetivo pacientes candidatas a quimioterapia, adyuvante o para enfermedad avanzada, según los criterios habituales y generalmente admitidos de administración de quimioterapia en pacientes con cáncer de mama. Como objetivos secundarios nos planteamos investigar si estas células constituyen signos objetivos de enfermedad en las pacientes con marcadores tumorales elevados y sin evidencia de enfermedad en las exploraciones convencionales, y averiguar la correlación de resultados en médula ósea y sangre periférica con la intención de facilitar la determinación de enfermedad micrometastásica, si la correlación fuese fiable.

El número de pacientes de cada grupo que se prestaron a realizar el estudio seriado, 112 en el de tratamiento adyuvante y 25 en el de metastásicas, nos pareció suficiente, tratándose de un estudio exploratorio de eficacia, similar a lo que podría ser un ensayo fase 2. Con respecto a los objetivos secundarios, consideramos que 25 pacientes en el grupo de marcadores elevados y 60 extracciones de sangre periférica eran suficientes para contestar a nuestra pregunta. Los números han sido escasos para analizar otras variables, como relación con factores pronóstico, que no entraban en los objetivos de este estudio pero que tienen indudable interés, por lo que se ha querido reseñar los datos más llamativos, desde un punto de vista puramente descriptivo, como base para diseñar posteriores estudios. De la misma forma, el tiempo de seguimiento de las pacientes en los diferentes grupos fue insuficiente para analizar y comparar supervivencias, cuestión que tampoco planteamos como objetivo de este trabajo pero que queda abierta para una evaluación ulterior.

Con el fin de estimar las dificultades de instauración de esta técnica dentro del circuito clínico habitual, intentamos que la extracción de médula ósea y la determinación de células tumorales se incluyera dentro del manejo estándar de las pacientes y el funcionamiento de los diferentes Servicios. Por este motivo la extracción no se realizó en quirófano en las pacientes recientemente intervenidas, sino tras su llegada a nuestra consulta, habitualmente 3 semanas después de la intervención. En las pacientes con enfermedad avanzada o con marcadores

elevados la extracción se fue realizando a medida que se constataba el diagnóstico.

De acuerdo con Diel IJ y cols⁷⁷, consideramos que el momento de la extracción, previo o posterior a la cirugía, no modifica los resultados en las pacientes con cáncer de mama. Estos autores no encontraron diferencias significativas en la positividad medular cuando la extracción se realizó en pacientes a las que ya se les había extirpado el tumor (32% presentaron células micrometastásicas) frente a aquellas a las que se practicó la extracción inmediatamente antes de la cirugía (la médula fue positiva en 38%). Por este motivo admitimos en el estudio a pacientes que recibieron quimioterapia de inducción previa a la cirugía, máxime cuando el criterio para elegir este tratamiento fue aleatorio en la mayor parte de los casos (ensayos clínicos randomizados en los que correspondió esta opción como tratamiento de entrada).

Sin embargo, y a pesar de la diferencia en el número de pacientes asignadas a tratamiento pre o postquirúrgico, observamos que la probabilidad de presentar células tumorales en médula ósea es mayor cuando la extracción se realiza antes de la extirpación del tumor primario, sin que esto pueda explicarse por otros factores ya que, como hemos dicho, la asignación a este tratamiento preoperatorio no fue debida a estadio más avanzado. Este hallazgo había sido apuntado por Mansi y cols⁸³, que observaron una reducción en la frecuencia de presentación de micrometástasis en médula cuando se realizaban aspirados repetidos tras la cirugía. Al cabo de meses o años de la extracción inicial, solo 2 pacientes presentaron positividad de 21 inicialmente positivas. También Molino y cols⁷⁶, como ya se ha comentado, detectaron células inmunocitoquímicamente positivas en médula ósea de pacientes con cáncer de mama en mayor proporción antes de la cirugía que varias semanas después, postulando la hipótesis de que quizá estas células en médula ósea son células circulantes liberadas por el tumor, atrapadas en los sinusoides medulares, que serán eliminadas y no reaparecerán tras la exéresis del tumor del que proceden. Sin embargo Weitz y cols⁷⁵, ya citados en la Introducción, analizaron mediante PCR muestras de sangre de pacientes con cáncer de colon antes, durante y después de la intervención quirúrgica y detectaron células tumorales en la mitad de los pacientes, de los cuales un 50% sólo presentó células circulantes en las muestras tomadas durante o después de la cirugía. Otros autores que han estudiado la médula en varios momentos evolutivos no encontraron diferencias entre antes y después, si bien

ninguno de ellos realizó extracción previa a la cirugía inicial^{80, 79}. Por ahora no hay ninguna recomendación especial sobre esto; la elección del momento más adecuado se subordina a la organización interna de cada institución. Nuestra observación debe ser confirmada en estudios dirigidos a tal objetivo, pero puede aportar información acerca del comportamiento de la enfermedad tumoral ante la eliminación del tumor primario.

Aunque las normas recientemente establecidas por la ISHAGE aconsejan al menos cuatro localizaciones de extracción, nosotros hemos seguido el procedimiento descrito en la mayoría de los trabajos publicados últimamente, con dos puntos de extracción (ambas crestas ilíacas)^{56, 73}. Decidimos realizar también biopsia ósea en ambas localizaciones, con el fin de relacionar los resultados en las muestras de aspirado con el estudio histopatológico convencional del hueso. Posteriormente dejamos de hacer biopsia en el grupo de pacientes de tratamiento adyuvante, al no obtener ningún resultado positivo en 117 muestras, independientemente del resultado del estudio inmunocitoquímico.

Con respecto al procesamiento de las muestras no observamos especiales problemas, aunque la laboriosidad y coste de la técnica dificultan su utilización generalizada. El anticuerpo A45-B/B3 es un anticuerpo monoclonal dirigido contra un epitopo común a distintas citoqueratinas del citoesqueleto de las células epiteliales, incluyendo los heterodímeros 8/18 y 8/19, y ha demostrado suficientemente su sensibilidad (probabilidad del 95% de detectar una célula tumoral en 2×10^6 células mononucleadas) y especificidad⁴⁹. La principal limitación descrita por todos los autores, y confirmada por el experimento del Grupo de trabajo para la estandarización de la técnica, de la ISHAGE⁷², es la variabilidad interindividual en la interpretación de las muestras. En nuestro caso no hubo discordancia en las muestras negativas, pero sí un 10% en las muestras positivas, correspondientes todas a extensiones con sólo una célula positiva, que uno de los evaluadores había considerado tumoral mientras que el otro la consideraba negativa. El carácter dudoso de estas muestras nos llevó a considerar como negativas todas aquellas en las que sólo aparecía una célula positiva para citoqueratina.

Otra limitación con la que nos hemos encontrado ha sido la del consentimiento de las pacientes, que en un 25% de los casos no aceptaron la segunda extracción de médula, generalmente por las molestias ocasionadas por la primera (dolor, desplazamiento, ansiedad, etc). Teniendo en cuenta la

laboriosidad la técnica y estos problemas, referidos también por otros autores⁷⁹, consideramos que para la instauración de esta técnica dentro del panel estándar de exploraciones al diagnóstico sería muy interesante mejorar los métodos de enriquecimiento de muestras⁵⁷, que permitan realizar la determinación en sangre periférica, y de selección automática de células inmuno-teñidas⁵⁸, que mejore la homogeneidad en la evaluación microscópica.

Al tratarse de un estudio exploratorio, sin que los escasos estudios anteriores hayan demostrado gran influencia de la quimioterapia en la eliminación de la celularidad oculta^{79, 80}, no incluimos un grupo control de pacientes sin quimioterapia en el que evaluar la evolución de la médula ósea, que en cualquier caso introduciría un sesgo al seleccionar o bien pacientes sin ningún factor de mal pronóstico, o con mala situación clínica que contraindica la quimioterapia.

Hemos observado positividad medular, es decir, presencia de células tumorales citoqueratina-positivas, en un 40% de las pacientes con cáncer de mama primario de reciente diagnóstico, en un 65% de las pacientes con enfermedad metastásica y en un 60% de las que presentan elevación del marcador CA15-3. Comentaremos estos hallazgos por separado, pero parece evidente que la proporción de células micrometastásicas en médula ósea es mayor a medida que la enfermedad está más avanzada, lo cual es lógico si, como la mayoría de los autores proponen, la enfermedad medular es expresión de la enfermedad diseminada. Más adelante trataremos este punto con detenimiento.

Entrando ya en el objetivo principal, es decir, la respuesta de las células tumorales ocultas en médula ósea a la quimioterapia, nos referiremos primero al grupo de tratamiento adyuvante, y en segundo lugar a las pacientes con enfermedad metastásica, para comentar posteriormente los resultados relacionados con los objetivos secundarios.

Detectamos la presencia de células tumorales micrometastásicas en médula ósea en un 40 % de las 152 pacientes con cáncer de mama primario de reciente diagnóstico, previamente a la administración de tratamiento adyuvante. Esta frecuencia es similar a la descrita en la literatura para este grupo de pacientes: 36% para Braun y cols⁷³, 38% para Harbeck y cols⁸¹, 43% para Diel y cols⁸². Molino y cols⁷⁹ comunican una frecuencia algo inferior, 31%, en pacientes con estadios I y II. Mansi y cols⁸³, que publican el estudio con mayor seguimiento, con un número elevado de pacientes, y encuentran un 25% de positividad, han

sido criticados por el anticuerpo utilizado. Ellos mismos reconocen que no es el más adecuado, por su baja especificidad. Por tanto nuestros resultados confirman la observación, ya extendida, de la elevada frecuencia de aparición de células tumorales ocultas en pacientes que se consideran libres de enfermedad, una vez extirpado el tumor primario. Esta microdiseminación pasa desapercibida para las exploraciones habituales de extensión de la enfermedad, lo que ha llevado a varios autores a proponer una subclasificación dentro del sistema de estadificación que incluya la enfermedad micrometastásica, aunque todavía no hay acuerdo sobre este punto, mientras no se demuestre suficientemente el valor pronóstico del hallazgo de enfermedad oculta en médula ósea⁷¹.

En nuestro estudio no se detecta relación estadísticamente significativa entre la presencia de células tumorales ocultas en médula ósea y otros factores pronósticos al diagnóstico, aunque podemos apreciar tendencia a la asociación con algunas categorías concretas, que comentaremos por el potencial interés que tienen para orientar posteriores investigaciones.

Las pacientes con tipo histológico lobulillar infiltrante parecen presentar microdiseminación medular con menos frecuencia que las de tipo carcinoma ductal infiltrante, aunque la escasa proporción de pacientes con el primer tipo (10%) no permite asegurar la diferencia. Ningún autor comunica asociación de un determinado tipo histológico con mayor o menor frecuencia de afectación medular micrometastásica, pero sí se ha detectado una mayor proporción de micrometástasis (detectadas inmunohistoquímicamente) en ganglios regionales en las pacientes con carcinoma lobulillar⁹³. La mayor tendencia a la invasividad local de este tipo histológico podría explicar este hallazgo, y también la menor frecuencia de microdiseminación sistémica.

Las pacientes del grupo de edad inferior a 37 años también parecen tener células tumorales ocultas en médula ósea en mayor proporción que el resto. No hay datos en la literatura que especifiquen la probabilidad de afectación inmunocitoquímica medular en relación con la edad, pero el resultado es compatible con la consideración de la edad más joven como factor independiente de mayor riesgo de recaída y muerte por cáncer de mama^{31, 32, 33, 34}, como ya se ha comentado en la introducción.

La médula ósea parece ser positiva con mayor frecuencia en pacientes con factores de mayor agresividad tumoral, como el tipo histológico 3, como también

han comunicado Braun y cols⁷³. Sin embargo no se aprecia relación con otros factores como el mayor tamaño tumoral, el mayor número de ganglios axilares afectos, o la ausencia de expresión de receptores hormonales, a diferencia de los datos publicados por el propio Braun⁷³, por Diel⁸² y por Mansi y cols⁸³. En la bibliografía revisada los datos son controvertidos: frente a los autores citados, Harbeck y cols⁸¹, y Molino y cols⁷⁹ no encuentran ninguna relación de la presencia de células tumorales ocultas en médula ósea con los diferentes factores pronósticos reconocidos. Quizá sea necesario un número de pacientes que permita distribuirlos en grandes grupos homogéneos para hallar correlación estadística, o quizá no exista esta asociación y la celularidad en médula sea, como teóricamente parece, un factor independiente, con la consiguiente utilidad para marcar pacientes de mal pronóstico no identificadas por otros factores.

Ya se ha introducido, en el apartado referente a la hipótesis de trabajo, la importancia de disponer de un marcador precoz de respuesta a quimioterapia adyuvante, que permita modificar el tratamiento según el efecto citotóxico observado. Con este fin analizamos comparativamente la médula ósea de 112 pacientes con cáncer de mama localizado, antes y después de la quimioterapia adyuvante con diferentes combinaciones de antraciclinas o de antraciclinas y taxanos, y encontramos positividad medular en 48/112 (42%) pacientes antes del tratamiento y en 34/112 (30%) pacientes después. La frecuencia de negativización fue 36/48 (75%), que se vio atemperada por la positivización de 22/64 (34%) médulas previamente negativas.

Nuestros resultados difieren en parte de los publicadas por Molino y cols⁷⁹ y Braun y cols⁸⁰, quienes tras el tratamiento adyuvante sólo aprecian 13/73 (18%) y 14/59 (23%) respuestas -negativización de la médula ósea- respectivamente en las pacientes con médula positiva inicial, sin cambios en la mediana del número de células antes y después del tratamiento. Nosotros hemos observado un claro efecto de la quimioterapia sobre las células micrometastásicas en médula ósea, con reducción tanto en el porcentaje de pacientes previamente positivas como en la mediana de células detectada post-tratamiento. La mayor quimiosensibilidad no parece ser consecuencia del esquema terapéutico, que no se describe en el trabajo de Molino y cols⁷⁹, pero que en el de Braun y cols⁸⁰ consistió en combinaciones de taxanos y epirrubicina con una intensidad de dosis adecuada. La única diferencia estriba en el momento de la segunda extracción, tres semanas después del último ciclo de quimioterapia en el estudio de Braun, mientras que

nosotros la realizamos a partir de 6-8 semanas del último ciclo, con lo que cabe la posibilidad de que el mayor tiempo transcurrido permita un mayor aclaramiento de las células dañadas.

La diferencia entre la positividad medular pre y post-tratamiento en las pacientes que reciben quimioterapia adyuvante no alcanza significación estadística, sin embargo, debido a un hecho que también ha sido comunicado por los autores citados^{79, 80}: un porcentaje de las pacientes con médula negativa pre-tratamiento - 34% en nuestro estudio- positivizan la médula después.

Por tanto, aunque las diferencias entre la primera y segunda extracción no son estadísticamente significativas, los resultados muestran que probablemente la quimioterapia es efectiva en un porcentaje importante de pacientes, que se ve reducido por la aparición de células tumorales ocultas en pacientes que antes no las tenían.

De aquí se puede extraer una consideración importante: a no ser que se trate de un falso negativo de la técnica en la primera extracción, cosa que no parece probable dada su sensibilidad, hay que deducir que las pacientes presentaban células ocultas en un número inferior al umbral de la técnica y que este número va aumentando hasta permitir su hallazgo en la segunda extracción. En este caso las pacientes estarían mostrando resistencia a la quimioterapia, hipótesis consistente con la observación preliminar de Braun y cols⁸⁰ con respecto a la evolución clínica de este grupo, igual a la del grupo de pacientes con médula positiva inicial, y peor que la de aquellas con médula negativa en las dos determinaciones. De confirmarse esta hipótesis, dispondríamos por primera vez del anhelado marcador de respuesta o de resistencia a la quimioterapia adyuvante en las pacientes con cáncer de mama, que permitiría modificar el tratamiento según la quimiosensibilidad observada, o plantear otras aproximaciones terapéuticas en las pacientes quimiorresistentes.

Tanto Braun⁸⁰ como otros investigadores^{49, 47} han postulado que la quimiorresistencia de las células micrometastásicas de una fracción de pacientes puede estar relacionada con el hecho de encontrarse esas células fuera de ciclo celular, en fase G₀, "durmientes", por lo que no resultarían afectadas por los fármacos que actúan en otras fases. Esta tesis se apoya en la baja capacidad proliferativa observada en las células tumorales ocultas^{49, 47}. De aquí se deduce que el grupo de pacientes con enfermedad residual medular podría ser candidato

a modalidades terapéuticas con acción independiente del ciclo celular, y en este sentido se desarrolla la investigación, aunque los trabajos son por el momento preliminares y escasos^{70, 122, 128, 129}.

En el grupo de pacientes metastásicas apreciamos positividad medular en 28/42 (65%) pacientes, de la cuales 40 presentaban recaída sistémica. La mediana de células tumorales en médula ósea fue 11 células/ 2×10^6 , superior a la que presentan las pacientes con cáncer de mama primario. La literatura acerca de la presencia de células tumorales ocultas en médula ósea de pacientes con cáncer de mama metastásico es escasa. Sólo Janni y cols⁸⁴ comunican un 16% de positividad en 32 pacientes con recaída local y un 73% en 33 pacientes con recaída sistémica. Un estudio previo, de Kamby y cols¹⁴¹, no ofrece resultados consistentes porque la determinación se realiza sobre biosias medulares y extensiones de sangre periférica, lo cual disminuye la sensibilidad al analizar un bajo número de células, y porque el anticuerpo utilizado -antimucinas- tiene una baja especificidad al presentar reactividad cruzada con células hemotopoyéticas.

Igual que en el grupo analizado por Janni⁸⁴, no encontramos relación estadísticamente significativa entre la positividad medular y los factores pronóstico clásicos que presentaron las pacientes en el momento del diagnóstico inicial de cáncer de mama, como el tamaño del tumor, afectación ganglionar, grado histológico, expresión de receptores hormonales o de erbB2 en las pacientes en las que se conocía este dato, y tampoco pudimos encontrar asociación con el mayor volumen tumoral, determinado por el número de localizaciones de metástasis.

El sitio de recaída sí parece tener relación, en nuestro grupo, con la presencia o ausencia de micrometástasis en médula ósea en ese momento. En las pacientes con recaída sistémica detectamos médula positiva con más frecuencia que en aquellas con recaída local, y dentro de la recaída sistémica, las pacientes con localizaciones viscerales y ósea presentan celularidad micrometastásica en médula ósea en mayor proporción que aquellas con recidiva ganglionar. Los resultados coinciden en parte con los descritos por Janni y cols⁸⁴, que encuentran metástasis óseas en 13 de 14 pacientes con médula positiva. Otros investigadores que han relacionado la presencia de médula ósea positiva -en el momento del diagnóstico primario- con las posteriores localizaciones de metástasis, comunican una mayor frecuencia de metástasis óseas en las pacientes con médula afecta⁷³. En nuestro grupo el número de pacientes con recidiva local

exclusiva es muy bajo, lógicamente, al incluir sólo pacientes candidatas a quimioterapia, por lo que este resultado tiene solo valor descriptivo.

La frecuencia de metástasis óseas parece un hecho lógico en pacientes con afectación micrometastásica medular, pero se supone que algún factor del microambiente medular o de otro tipo estimula la metastatización ósea en el cáncer de mama, dado que otros tumores –gástrico, colon- con la misma frecuencia de celularidad medular oculta presentan escasa diseminación ósea abierta^{47, 48, 55}.

La respuesta a la quimioterapia en las pacientes metastásicas fue algo más evidente que en las de tratamiento adyuvante, como puede apreciarse gráficamente en la figura 20. Antes de la quimioterapia 19/25 (76%) pacientes presentaban médula positiva; después, sólo 6/25 (24%) mantenían la positividad, aunque la mediana del número de células se redujo casi en un 50%. No observamos en este grupo positivización medular en ninguna de las pacientes previamente negativas.

El hecho de que en las pacientes metastásicas no apreciemos positivización medular en ningún caso puede deberse al pequeño número de enfermas con médula inicial negativa. No podemos contrastar nuestros datos con los de otros autores, pues no hay trabajos publicados, en la bibliografía encontrada, que estudien el efecto de la quimioterapia en estas pacientes. Podríamos sin embargo especular que la quimiosensibilidad de las micrometástasis medulares en la enfermedad metastásica posiblemente es mayor que la de las células ocultas en las pacientes sin evidencia de recidiva, células que en gran parte se encuentran en fase latente. En la enfermedad avanzada probablemente las células están activas y en fase proliferativa, como indican los trabajos -ya comentados- que detectan mayor número de aberraciones cromosómicas en las células tumorales ocultas de pacientes con enfermedad diseminada¹⁰¹

La respuesta medular, que fue por tanto muy evidente, no predijo la respuesta de las otras localizaciones. El número de pacientes con médula ósea previamente positiva y respuesta parcial o enfermedad estable extramedular que negativizaron el resultado en médula ósea fue mayor que el de pacientes con respuesta completa y negativización medular. Al no haber positivización medular ni progresión de enfermedad extramedular en los primeros 6 meses no pudimos correlacionar este hecho con los cambios en médula ósea en el momento de la

primera valoración de respuesta. Es interesante sin embargo destacar que, hasta el momento, con una mediana de seguimiento de 10.7 meses, todas las progresiones de pacientes metastásicas, menos una, han tenido lugar en pacientes con médula ósea positiva en la recaída. El seguimiento de las pacientes es demasiado corto para realizar ningún otro análisis, que queda pendiente para una revisión posterior, dado el enorme interés que tiene conocer el valor pronóstico de este parámetro también en las pacientes con enfermedad avanzada. Janni y cols⁸⁴, con una mediana de seguimiento de 37 meses, observan una evolución significativamente peor para las pacientes con positividad medular, quienes presentan una supervivencia mediana 4 veces menor que aquellas con médula ósea negativa (4.4 versus 16.8 meses). Estos autores concluyen que –si bien sus resultados deben ser confirmados en estudios más amplios– el número de células tumorales en médula ósea en el momento de la primera recaída en el cáncer de mama es un nuevo factor pronóstico que viene a unirse a los escasos factores de que disponemos en la enfermedad metastásica, para seleccionar grupos de pacientes en los que estaría indicado un tratamiento más agresivo.

Nuestro trabajo es el primero que analiza la respuesta a quimioterapia de las células ocultas en médula ósea en pacientes con cáncer de mama metastásico. Con los resultados obtenidos hasta ahora no podemos extraer conclusiones fiables acerca del valor de la quimioterapia en estas pacientes, o de la importancia de monitorizar la respuesta medular. Da la impresión de que la enfermedad sistémica tiene un comportamiento independiente del de la enfermedad residual medular, pero sería importante comprobar, con un seguimiento mayor y mayor número de pacientes, si este comportamiento se homogeneiza, o si la evolución de las células tumorales en la médula predice mejor la de la enfermedad neoplásica en general. En muchas ocasiones no es fácil evaluar la respuesta a quimioterapia por técnicas de imagen, o incluso no se puede por no ser la enfermedad medible, lo cual puede llevar a errores en la apreciación de la respuesta. Disponer de un marcador cuantificable con relativa facilidad, como es el número de células en médula ósea, podría resultar de gran ayuda para conocer con precisión la eficacia del tratamiento, además de permitirnos simplificar el manejo de las pacientes.

Con respecto a las pacientes con cáncer de mama y marcadores tumorales séricos elevados sin evidencia de recaída, encontramos células tumorales micrometastásicas en médula ósea en 15/25 (60%) pacientes, con una mediana

de células de 7 por cada 2 millones de células mononucleadas. No se ha publicado ningún estudio que investigue la celularidad tumoral oculta en pacientes con marcadores séricos elevados, pero el hallazgo de una frecuencia de positividad similar a la de las pacientes metastásicas es compatible con la elevada probabilidad de recaída de estas pacientes, y apoya nuestra hipótesis de que las células ocultas expresan enfermedad mínima residual. Como en los grupos anteriores (pacientes de tratamiento adyuvante y pacientes con enfermedad metastásica demostrada), no encontramos relación con ninguno de los factores pronóstico clásicos del tumor primario.

La frecuencia de progresión de enfermedad, con una mediana de seguimiento de 14 meses, fue mayor en el grupo de médula ósea positiva. De las 15 pacientes con médula ósea positiva, constatamos progresión de enfermedad en 8 (53%), mientras que de las 10 con médula negativa han progresado 3 (30%). Esta diferencia no es estadísticamente significativa, aunque es posible que un mayor seguimiento ofrezca resultados más concluyentes. El escaso número de eventos en las pacientes con médula negativa no permite tampoco realizar comparaciones fiables. No hay tampoco seguimiento ni eventos suficientes para realizar estudio de supervivencia, que –como en los casos anteriores– no entraba en los objetivos del presente estudio, aunque se realizará más adelante.

Los resultados de nuestro estudio en este grupo de pacientes, no añaden por ahora especial información a la que ya proporciona de por sí el marcador elevado. El interés de nuestros resultados estriba más bien en poner de manifiesto signos objetivos de enfermedad en un porcentaje elevado de pacientes, y abrir por tanto una puerta a la investigación clínica en esta situación, en la que, como varios autores han comunicado, la probabilidad de recaída es inminente en un 25-65% de los casos¹¹⁰. Vizcarra y cols^{138, 139} publicaron que la elevación del CA 15-3 predijo la recaída en 28/63 (44%) pacientes, de un total de 444 pacientes libres de enfermedad seguidas durante 36 meses.

Teóricamente, la probabilidad de controlar una neoplasia es mayor cuanto menor es el volumen tumoral. La elevación confirmada de marcadores séricos es probablemente un signo claro de enfermedad subclínica¹¹⁰. Esta situación es, por tanto, ideal para realizar intentos terapéuticos con intención incluso curativa. Sin embargo la norma de no tratar pacientes asintomáticos sin enfermedad objetiva y evaluable ha hecho que muy pocos tratamientos se hayan ensayado en estas

pacientes. Aunque algún grupo que ha ensayado la hormonoterapia en estas pacientes comunica una reducción en la proporción de recaídas, hasta el momento no se ha demostrado con un grado de evidencia suficiente la ventaja de un inicio precoz de ningún tratamiento citostático ni de otro tipo. Se asume que la actitud ha de ser expectante, con la consiguiente intranquilidad para el paciente y el médico, que han de esperar impotentes una más que probable progresión de la enfermedad.

Ravdin ¹¹⁰ describe un posible futuro, en que los marcadores tumorales elevados serán tan sensibles y específicos que reflejarán verdaderamente la enfermedad micrometastásica y permitirán tratar a las pacientes que realmente lo necesiten en un momento en que la enfermedad es tan mínima que podría ser curable con quimioterapia, abandonando el objetivo paliativo que es la meta actual en la enfermedad metastásica. En esta situación ideal no sería necesario el tratamiento adyuvante tal y como se administra ahora, sino que sólo lo recibirían las pacientes con evidencia de enfermedad residual objetiva. La detección de células tumorales ocultas en médula ósea puede ser la evidencia de enfermedad que todos buscamos en estas pacientes, con la ventaja de ser potencialmente curable, por su pequeño volumen.

En referencia al último objetivo, la correlación entre la detección de células tumorales en sangre periférica y en médula ósea es escasa con el procedimiento descrito. Hemos detectado sólo 3 muestras de sangre periférica positivas entre 60 determinaciones, mientras que la médula ósea mostró positividad en 26 de los 60 casos. El hecho de que no aparezcan células en sangre periférica de las pacientes con médula negativa, y la observación de que en los tres casos de sangre positiva el número de células en la médula fue mayor de 5×10^6 lleva a pensar que la aparición de células circulantes en sangre es una consecuencia de su presencia en médula, y que la sensibilidad de la técnica en sangre es muy inferior a la que muestra cuando se aplica a la médula ósea. Sería necesario repetir el estudio tras enriquecer la sangre periférica mediante esferas inmunomagnéticas método cuya utilidad ha sido comunicada en varias ocasiones⁵⁷. Nos parece interesante continuar la investigación en este sentido, por lo mucho que facilitaría el procedimiento el poder realizar el estudio en sangre periférica, teniendo en cuenta que cualquier ensayo clínico basado en el número de células micrometastásicas comporta extracciones seriadas, con la consiguiente incomodidad para las pacientes. Ya hemos comentado, y otros grupos han

encontrado el mismo problema⁷⁹, la dificultad para que las pacientes consientan en repetir la exploración.

El factor “presencia de células ocultas en médula ósea” ha sido hasta ahora un elemento descriptivo más en las pacientes con cáncer de mama, sin que se haya considerado determinante de ninguna decisión terapéutica, a pesar de su valor pronóstico cada vez más reconocido. Esto se debe a la comprensible cautela con que se debe acoger un descubrimiento de este tipo, dada la toxicidad e incluso riesgo de mortalidad de la terapéutica del cáncer, que hace indeseable su administración si no está claramente establecido el beneficio. Pero ahora que el método de determinación está cada vez más maduro y asequible para realizar como técnica prácticamente estándar de laboratorio, va llegando el momento de promover ensayos clínicos con las pacientes en diferentes situaciones evolutivas, para aclarar en qué medida la intervención sobre la enfermedad subclínica influye en la evolución de la enfermedad.

VI. CONCLUSIONES

1. La presencia de células tumorales ocultas en médula ósea en pacientes con cáncer de mama es un hecho frecuente en diferentes momentos evolutivos de la enfermedad. Tanto la frecuencia de detección como el número de células observado parece ser progresivo a medida que la enfermedad es más avanzada. No parece, en nuestro grupo de paciente, que la observación de enfermedad micrometastásica en médula ósea tenga relación con los factores pronósticos que clásicamente se aceptan como indicadores de mayor agresividad tumoral.
2. La quimioterapia, tanto en el tratamiento adyuvante como en situación de enfermedad metastásica, consigue eliminar la celularidad oculta en médula ósea en más de la mitad de las pacientes y, en el caso del tratamiento adyuvante, señala un grupo de pacientes con enfermedad quimiorresistente, tanto por persistencia de positividad como por aparición de células micrometastásicas en médulas previamente negativas, que representa un tercio del total. La importancia de esta observación en la evolución de las pacientes está todavía por determinar.
3. En el grupo de pacientes metastásicas la respuesta a quimioterapia en médula ósea no coincide con la respuesta de la enfermedad extramedular. Hace falta un mayor seguimiento para evaluar si la eliminación de la enfermedad medular refleja el comportamiento de la neoplasia con más fiabilidad que las técnicas convencionales de evaluación de respuesta.
4. Aparentemente la presencia de enfermedad micrometastásica en médula ósea de pacientes con metástasis se relaciona con enfermedad diseminada visceral y ósea en mayor proporción que con enfermedad local o ganglionar.
5. En las pacientes con marcadores tumorales elevados sin evidencia de recaída la presencia de células tumorales ocultas en médula ósea representa un signo objetivo de enfermedad subclínica. Esta observación abre la puerta a la investigación de tratamientos específicos dirigidos a reducirla o eliminarla.
6. Finalmente, la sangre periférica no es por el momento un lugar adecuado para la investigación de células micrometastásicas, por la escasa sensibilidad de la técnica en este medio.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Alberg AJ, Helzlsouer KJ. Epidemiology, prevention and early detection of breast cancer. *Curr Opin Oncol* 1997; 9: 505-515.
- ² Ferlay J, Black R.J., Pisani P., Valdivieso M.T., Parkin, D.M. EUCan90: Cancer in the European Union. IARC Cancer Base Nº 1. Lyon International Agency for Research on Cancer, 1996
- ³ Viladiu P, López López JJ. Aspectos generales del cáncer de mama. En: Cortés-Funes H, Díaz-Rubio E, García-Conde J, et al: *Oncología Medica. Nova Sidonia Oncología*. Madrid 1999, pp 877-888.
- ⁴ Harris JR, Hellman S. Natural history of breast cancer. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Hellman S (eds): *Diseases of the breast*. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia 1999.
- ⁵ Bloom H, Richardson W, Harrier E. Natural history of untreated breast cancer (1805-1933), *BMJ* 1962, 2: 213-218.
- ⁶ Fox M. On the diagnosis and treatment of breast cancer. *JAMA* 1979; 241: 489-494.
- ⁷ Brinkley D, Haybittle J. Long term survival of women with breast cancer. *Lancet* 1984; 1: 1118-1123.
- ⁸ Joensuu H, Toikkanen S. Cured of breast cancer? *J Clin Oncol* 1995, 13:62-69.
- ⁹ Saphner T, Tormey D, Gray R. Annual hazard rates of recurrence for breast cancer after primary therapy. *J Clin Oncol* 1996, 14: 2738-2746.
- ¹⁰ Azagra P, García T, Martínez de Dueñas E, Insa A, Lluch A, Marugan M, et al. Natural history of breast cancer. Annual hazard of recurrence after surgery. *Eur J Cancer* 1998; 34 (Supl 2): 6
- ¹¹ Adair F, Berg J, Joubert L. Long term follow-up of breast cancer patients: the 30-year report. *Cancer* 1974; 33:1145-1150.
- ¹² Rosen PP, Groshen S, Siago PE. A long term follow up study of survival in stage I (T1N0M0) and stage II (T1N1M0) breast carcinoma. *J Clin Oncol* 1989; 7: 355-361.
- ¹³ Jones SE, Moon T, Bonadonna G, Valagussa P, Rivkin S, Buzdar A et al. Comparison of different trials of adjuvant chemotherapy in stage II breast cancer using a Natural History Data Base. *Am J Clin Oncol* 1987; 5:387-395.
- ¹⁴ Hellman S. Natural history of small breast cancers (Karnofsky memorial lecture). *J Clin Oncol* 1994; 12: 2229-2234.
- ¹⁵ Fisher B. Laboratory and clinical research in breast cancer.- A personal adventure: The David A. Karnofsky Memorial Lecture. *Cancer Res* 1980; 40: 3863-3874.
- ¹⁶ Fisher B, Redmond C, Fisher ER, Bauer M, Wolmark N, Wickerham DL, et al. Ten year results of a randomized clinical trial comparing radical mastectomy and total mastectomy with or without radiation. *N Eng J Med* 1985; 312: 674-681.
- ¹⁷ Fisher B, Redmond C, Poisson R, Margoless R, Wolmark N, Wickerham DL, et al. Eight year results of a randomized clinical trial comparing total mastectomy and lumpectomy with and without irradiation in the treatment of breast cancer. *N Eng J Med* 1989; 320: 822-828.

-
- ¹⁸ Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic or immune therapy: 33 randomized trials involving 31000 recurrences and 24000 deaths among 75000 women. *Lancet* 1992; 339: 1-15, 71-85.
- ¹⁹ Ellegde RM, Mc Guire L and Osborne K. Prognostic factors in breast cancer. *Semin oncol* 1992; 19: 244-253.
- ²⁰ Burke HB, Henson DE. Criteria for prognostic factors and for an enhanced prognostic system. *Cancer* 1993; 72: 3131-3135.
- ²¹ Cody HS, Urban JA. The role of axillary dissection in managing patients with breast cancer: the case for complete axillary clearance. En: Wise L, Johnson H (eds). *Breast cancer: controversies in management*. Armonk, Futura Publishing Company 1994, 169-176.
- ²² Shibata HR. How important is full axillary dissection: the case for surgery without full dissection. En : Wise L, Johnson H (eds). *Breast cancer: controversies in management*. Armonk, Futura Publishing Company 1994, 169-176.
- ²³ Saez RA, McGuire WL, Clark GM. Prognostic factors in breast cancer. *Semin Surg Oncol* 1989;5:102-109
- ²⁴ Valagussa P, Bonadonna G, Veronesi V. Patterns of relapse and survival following radical mastectomy. *Cancer* 1978; 41: 1170-1177.
- ²⁵ Carter C, Allen C, Henson D. Relation of tumor size, lymph node status and survival in 24.740 breast cancer cases. *Cancer* 1989; 63:181-186.
- ²⁶ McGuire WL, Clark GM. Prognostic factors and treatment decisions in axillary-node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 1992;326:1756
- ²⁷ Fisher ER, Redmond C, Fisher B. Histologic grading of breast cancer. *Pathol Ann* 1980;15: 239-244.
- ²⁸ Harvey JM, de Klerk NH, Sterrett GF. Histological grading in breast cancer: interobserver agreement, and relation to other prognostic factors including ploidy. *Pathology* 1992; 24: 63-.
- ²⁹ Dalton LW, Page DL, Dupont WD. Histologic grading of breast carcinoma. A reproducibility study. *Cancer* 1994; 73: 2765-2771.
- ³⁰ Le Doussal V, Tubiana-Hulin M, Friedman S. Prognostic value of histologic grade nuclear components of Scarff-Bohm-Richardson (SBR): an improved score modification based on a multivariate analysis of 1262 invasive ductal breast carcinomas. *Cancer* 1989; 64:1914-1920.
- ³¹ Nixon AJ, Neuberg D, Hayes EF. Relationship of patient age to pathologic features of the tumor and prognosis for patients with stage I or II breast cancer. *J Clin Oncol* 1994; 12: 888-894.
- ³² Albain KS, Allred DC, Clark GM. Breast cancer outcome and predictors of outcome: are there age differentials? *J Natl Cancer Inst Mongr* 1994; 16: 35-42.
- ³³ Lluch A, Martinez E, Prosper F, Garcia T, Sastre JM, Azagra P et al: Age as a prognostic factor for patients with breast cancer: relationship with pathological and biological features. *Proc Am Soc Clin Oncol* 19:579, 2000 (abstr)
- ³⁴ Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Senn H-J. Meeting highlights: international consensus panel on the treatment of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 1601-1609.

-
- ³⁵ Clark GM, Osborne KC, Mc Guire W. Correlations between estrogen receptor, progesterone receptor and patients characteristics in human breast cancer. *J Clin Oncol* 1984; 2: 1102-1109.
- ³⁶ Mason BH, Holdaway IM, Mullins PR, Yee L, Kay R. Progesterone and estrogen receptors as prognostic variables in breast cancer. *Cancer Res* 1983;43:2985-2990.
- ³⁷ Azagra P. Estudio sobre receptores hormonales, catepsina D y proteína PS2 y su valor pronóstico en cáncer de mama. Tesis doctoral. Facultad de Medicina. Universidad de Valencia, 1997.
- ³⁸ Azagra P, Lluch A, Martínez Agullo A, García T, Martínez de Dueñas E, Juan O, et al. Hormonal receptors as prognostic factors in breast cancer: a retrospective study of 1474 patients in a single institution. Eight International Congress on anti-Cancer Treatment. París, febrero 1998 (abstr).
- ³⁹ Wenger CR, Clark GM. S-Phase fraction and breast cancer: a decade of experience. *Breast Cancer Res* 1997; 51: 255-261.
- ⁴⁰ Ravdin PM, Chamness GC. The c-erbB2 proto-oncogene as a prognostic and predictive marker in breast cancer: a paradigm for the development of other macromolecular markers—a review. *Gene* 1995; 159: 19-26
- ⁴¹ Paik S, Bryant J, Park C, et al. ErbB-2 and response to doxorubicine in patients with axillary lymph node-positive, hormone receptor-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90:1361
- ⁴² Thor AD, Berry DA, Budman D, Muss HB, Kute T. ErbB-2, p53, and efficacy of adjuvant therapy in lymph node-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 1346-51.
- ⁴³ Dickson RB and Lippman ME: Molecular determinants of growth, angiogenesis and metastases in breast cancer. *Semin Oncol* 1992; 19: 286-298.
- ⁴⁴ Salsbury AJ. The significance of the circulating cancer cells. *Cancer Treat Rev* 1975, 2: 55-61.
- ⁴⁵ Ross A: Minimal residual disease in solid tumor malignancies: A review. *J Hematother* 1998; 7: 9-18.
- ⁴⁶ Harbeck N; Abdulsalam A; Jänicke F. Clinical relevance of detection of tumor cells in the bone marrow of primary breast cancer patients: a review. *Onkologie* 1997; 20: 387-392.
- ⁴⁷ Pantel K, Von Knebel Doeberitz M. Detection and clinical relevance of micrometastatic cancer cells. *Curr Opin Oncol* 2000, 12: 95-101.
- ⁴⁸ Jauch K.W, Friess S, Grützner U, Heiss M, Funke I. Prognostic significance of "micrometastases". *Onkologie* 1995; 18: 525-532
- ⁴⁹ Pantel K, Cote R, Fodstad O: Detection and clinical importance of micrometastatic disease. *J Natl Cancer Inst* 1999, 91: 1113-1124.
- ⁵⁰ Sloane JP, Ormerod MG, Imrie SF and Coombes R. The use of antisera to epithelial membrane antigen in detecting micrometastases in histological sections. *Br J Cancer* 1980, 42: 392-398
- ⁵¹ Dearnely DP, Sloane JP, Ormerod MG, Steele K, Coombes RC, Clink HM et al. Increased detection of mammary carcinoma cell using antisera to epithelial membrane antigen. *Br J Cancer* 1981; 44: 85-90.
- ⁵² Ridell B, Landys K. Incidence and histopathology of metastases of mammary carcinoma in biopsies from the posterior iliac crest. *Cancer* 1979, 4: 1782-1788.

-
- ⁵³ Landys K, Persson S, Kovarik J, Hultborn R and Holmberg E. Prognostic value of bone marrow biopsy in operable breast cancer patients at the time of initial diagnosis: results of a 20-year median follow-up. *Breast Cancer Res and Treat* 1998; 49, 27-33.
- ⁵⁴ Lalle M, De Rosa L, Marzetti L, Montuoro A. Detection of breast cancer cells in the bone marrow or peripheral blood: methods and prognostic significance. *Tumori* 2000, 86:183-190.
- ⁵⁵ Moss T. : Clinical relevance of minimal residual cancer in patients with solid malignancies. *Cancer and Metastasis Reviews* 1999, 18: 91-100
- ⁵⁶ Pantel K, Schlimok G, Angstwurm M, Weckermann D, Schmaus W, Gath H et al. Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow. *J Hematother* 1994, 3: 165-173.
- ⁵⁷ Naume B, Borgen E, Beiske K, Herdstad TK, Ravnas G, Renolen A, et al. Immunomagnetic techniques for the enrichment and detection of isolated breast carcinoma cells in bone marrow and peripheral blood. *J Hematother* 1997; 6: 103-114.
- ⁵⁸ Bauer KD, de la Torre-Bueno J, Diel I, Hawes D, Decker W, Priddy C et al. Reliable and sensitive analysis of occult bone marrow metastases using automated cellular imaging. *Clin Cancer Res* 2000, 6: 3552-3559.
- ⁵⁹ Smith B, Selby P, Southgate J, Pittman K, Bradley C, Blair GE. Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *Lancet* 1991; 338: 1227-1229.
- ⁶⁰ Fields KK, Eifenbein GJ, Trudeau WL, Perkins JB, Janssen WE, Mascinski LC. Clinical significance of bone marrow metastases as detected using the polymerase chain reaction in patients with breast cancer undergoing high dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation. *J Clin Oncol* 1996; 14: 1868.
- ⁶¹ Slade MJ, Smith BM, Sinnet HD, Cross NCP, Coombes RC. Quantitative polymerase chain reaction for the detection of micrometastases in patients with breast cancer. *J Clin Oncol* 1999, 17: 870-875
- ⁶² Zach O, Kasparu H, Krieger O, Hehenwarter W, Girschikofsky M, Lutz D. Detection of circulating mammary carcinoma cells in the peripheral blood of breast cancer patients via a nested reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for mammaglobin mRNA. *J Clin Oncol* 1999, 17: 2015-2019.
- ⁶³ Grünwald K, Haun M, Urbanek M, Fiegl M, Müller-Holzner E, Gunsilius E et al. Mammaglobin gene expression: a superior marker of breast cancer cells in peripheral blood in comparison to epidermal-growth-factor receptor and cytokeratin-19. *Lab Invest* 2000, 80: 1071-1077.
- ⁶⁴ Zippelius A, Kufer P, Honold G, Kollerman MW, Oberdener R, Schlimok G, et al. Limitations of reverse-transcriptase polymerase chain reaction analysis for detection of micrometastatic epithelial cancer cells in bone marrow. *J Clin Oncol* 1997, 15: 2701-2708.
- ⁶⁵ Jung R, Soondrum K, Kruger W, Neumaier M. Detection of micrometastasis through tissue-specific gene expression: its promise and problems. *Recent Results Cancer Res* 2001, 158: 32-39.
- ⁶⁶ Tokunaga E, Maehara Y, Oki E, Koga T, Kakeji Y, Sugimachi K. Application of quantitative RT-PCR using "TaqMan" technology to evaluate the expression of CK-18 mRNA in various cell lines. *J Exp Clin Cancer Res* 2000, 19: 375-381

-
- ⁶⁷ Salmon SE, Hamburger AW, Soehnen B, Durie BGM, Alberts DS, Moon TE. Quantitation of differential sensitivity of human-tumor stem cells to anticancer drugs. *New Eng J Med* 1978, 298: 1321-1326.
- ⁶⁸ Ross AA, Cooper BW, Lazarus HM, MacKay W, Moss TJ, Ciobanu N et al. Detection and viability of tumor cells in peripheral blood stem cell collections from breast cancer patients using immunocytochemical and clonogenic assay techniques. *Blood* 1993, 82: 2605-2610.
- ⁶⁹ Pantel K, Dickmanns A, Zippelius A, Klein C, Shi J, Hoechtlen-Vollmar W, et al. Establishment of micrometastatic carcinoma cell lines: a novel source of tumor cell vaccines. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87:1162-1168
- ⁷⁰ Pantel K, Felber E, Schlimok G. Detection and characterization of residual disease in breast cancer. *J Hematother* 1994, 3: 315-322.
- ⁷¹ Funke I and Schraut W. Meta-analyses of studies on bone marrow micrometastases: an independent prognostic impact remains to be substantiated. *J Clin Oncol* 1998, 16: 557-566.
- ⁷² The European ISHAGE Working Group for Standardization of Tumor Cell Detection. Standardization of the immunocytochemical detection of cancer cells in BM and blood: I. establishment of objective criteria for the evaluation of immunostained cells. *Cytotherapy* 1999; 1: 377-388.
- ⁷³ Braun S, Pantel K, Müller P, Janni W, Hepp F, Kentenich C et al. Cytokeratin positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II or III breast cancer. *N Eng J Med* 2000, 324: 525-533.
- ⁷⁴ Braun S, Muller M, Hepp F, Schlimok G, Riethmuller G, Pantel K. Re: Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status. *J Natl Cancer Inst* 1998, 90: 1099-1101
- ⁷⁵ Weitz J, Kienle P, Lacroix J, Willeke F, Benneer A, Lehnert T et al. Dissemination of tumor cells in patients undergoing surgery for colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 1998, 4:343-348.
- ⁷⁶ Molino A, Pelosi G, Turazza M, Sperotto L, Bonetti A, Nortilli R, et al. Bone marrow micrometastasis in 109 cancer patients: Correlations with clinical and pathological features and prognosis. *Breast Cancer Res Treat* 1997, 42: 23-30.
- ⁷⁷ Diel IJ, KaufmannM, Goerner R, Costa SD, Kaul S, Bastert G. Detection of tumor cells in bone marrow of patients with primary breast cancer. *J Clin Oncol* 1992, 10: 1534-1539.
- ⁷⁸ Heiss MM, Allgayer H, Gruetzner KU, Funke I, Babic R, Jauch KW, et al. Individual development and uPA-receptor expression of disseminated tumor cells in bone marrow: a reference to early systemic disease in solid cancer. *Nat Med* 1995, 1.1035-1039. Citada por: ⁷⁸ Pantel K, Von Knebel Doeberitz M. Detection and clinical relevance of micrometastatic cancer cells. *Curr Opin Oncol* 2000, 12: 95-101.
- ⁷⁹ Molino A, Pelosi G, Micciolo R, Turazza M, Nortilli R, Pavanel F and Cetto GL. Bone marrow micrometastases in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 1999; 58: 123-130.
- ⁸⁰ Braun S, Kentenich C, Janni W, Hepp F, de Waal J, Willgeroth F, et al. Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high risk breast cancer patients. *J Clin Oncol* 2000; 18: 80-86.
- ⁸¹ Harbeck N, Untch M, Pache L, Eiermann W. Tumour cell detection in the bone marrow of breast cancer patientes at primary therapy: results of a 3-year median follow-up. *Br J Cancer* 1994, 69, 566-571.

-
- ⁸² Diel IJ, Kaufmann M, Costa S, Holle R, von Minckwitz G, Solomayer EF, et al. Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status. *J Natl Cancer Inst*, 1996; 88: 1652-1658.
- ⁸³ Mansi J, Gogas H, Bliss J, Gazet JC, Berger U, Coombes RC. Outcome of primary breast cancer patients with micrometastases: a long term follow up study. *Lancet* 1999; 354: 197-202.
- ⁸⁴ Janni W, Gastroph S, Hepp F, Kentenich C, Rjosk D, Schindlbeck C et al. Prognostic significance of an increased number of micrometastatic tumor cells in the bone marrow of patients with first recurrence of breast carcinoma. *Cancer* 2000; 88: 2252-2259
- ⁸⁵ Fetsch P; Cowan K, Weng D, Freifield A, Filie A, Abati A. Detection of circulating tumor cells and micrometastasis in stage II, III and IV breast cancer patients utilizing cytology and immunocytochemistry. *Diagn Cytopathol* 2000; 22: 323-328.
- ⁸⁶ Lindemann F, Schlimok G, Dirschedl P, Witte J, Riethmuller G. Prognostic significance of micrometastatic tumour cells in the bone marrow of colorectal cancer patients. *Lancet* 1992; 340: 685-689. Citada en: Pantel K, Cote R, Fodstad O: Detection and clinical importance of micrometastatic disease. *J Natl Cancer Inst* 1999, 91: 1113-1124.
- ⁸⁷ Jauch KW, Heis MM, Gruetzner U, Funke I, Pantel K, Babic R, et al. Prognostic significance of bone marrow micrometastases in patients with gastric cancer. *J Clin Oncol* 1996; 14: 1810-1817.
- ⁸⁸ Thorban S, Roder JD, Nekarda H, Funk A, Pantel K, Siewert JR. Disseminated epithelial tumor cells in bone marrow of patients with esophageal cancer: detection and prognostic significance. *World J Surg* 1996; 20: 567-572. Citada por: Pantel K, Von Knebel Doeberitz M. Detection and clinical relevance of micrometastatic cancer cells. *Curr Opin Oncol* 2000, 12: 95-101.
- ⁸⁹ Cote RJ, Beattie EJ, Chaiwun B, Shi SR, Harvey J, Chen SC et al. Detection of occult bone marrow micrometastasis in patients with operable lung carcinoma. *J Clin Oncol* 1991; 9: 1740-1756.
- ⁹⁰ Pantel K, Izbicki J, Passlick B, Angstwurm M, Haussinger K, Thetter o et al. Frequency and prognostic significance of isolated tumour cells in bone marrow of patients with non-small-cell lung cancer patients. Comparison of immunologic and morphologic methods. *Lancet* 1996; 347: 649-653.
- ⁹¹ Braun S, Schindlbeck C, Hepp F, Janni W, Kentenich C, Riethmüller G et al. Occult tumor cells in bone marrow of patients with locoregionally restricted ovarian cancer predict early distant metastatic relapse. *J Clin Oncol* 2001; 19: 368-375.
- ⁹² Roder JD, Thorban S, Pantel K, Siewert JR. Micrometastases in bone marrow: prognostic indicators for pancreatic cancer. *World J Surg* 1999; 226: 888-891. Citado por: Pantel K, Von Knebel Doeberitz M. Detection and clinical relevance of micrometastatic cancer cells. *Curr Opin Oncol* 2000, 12: 95-101.
- ⁹³ Cote RJ, Peterson HF, Chaiwun B, Gelber RD, Goldhirsch A, Castiglioni-Gertsch M: Role of immunohistochemical detection of lymph-node metastases in management of breast cancer. *Lancet* 1999; 354: 896-900.
- ⁹⁴ Diel IJ, Cote RJ. Bone marrow and lymph node assesment for minimal residual disease in patientes with breast cancer. *Cancer Treat Rev* 2000, 26: 53-65.

-
- ⁹⁵ Relihan N, McGreal G, Kelly J, Ryan D, O'Sullivan GC, Redmon HP. Combined sentinel lymph-node mapping and bone-marrow micrometastatic analysis for improved staging in breast cancer. *Lancet* 1999, 354: 129-130 (letter)
- ⁹⁶ Gerber B, Krause A, Müller H, Richter D, Reimer T, Makovitzky J et al. Simultaneous immunohistochemical detection of tumor cells in lymph nodes and bone marrow aspirates in breast cancer and its correlation with other prognostic factors. *J Clin Oncol* 2001, 19: 960-971.
- ⁹⁷ Braun S, Cevatli S, Assemi C, Janni W, Kantenich C, Schindlbeck C et al. Comparative analysis of micrometastasis to the bone marrow and lymph nodes of node negative breast cancer patients receiving no adjuvant therapy. *J Clin Oncol* 2001, 19: 1468-1475.
- ⁹⁸ Pecora AL, Lazarus HM, Cooper B, Kennedy MJ, Umiel T, Meagher R et al. Breast cancer contamination in peripheral blood stem cell collections association with bone marrow disease and type of mobilization. *Blood* 1997, 90, suppl 1, 99a
- ⁹⁹ Ross AA, Cooper BW, Lazarus HM, Moss TJ, Sweet DS, Winter C et al. Different rates of detection of breast cancer cells in peripheral blood stem cell collections in single vs multiple specimens. *Proc Amer Soc Clin Oncol* 1994, 13: 64.
- ¹⁰⁰ Bills AC, Green WF, Tsodikov A, Carey MJ, Perkins SL, Petersen FB et al. Cytokeratin-positive cells in PBSC collections from normal donors and patients with non-epithelial cell-derived tumors. *Cytotherapy* 1999, 1: 389-399.
- ¹⁰¹ Engel H, Kleespies, C, Friedrich J, Breidenbach M, Kallenborn A, Schöndorf T et al. Detection of circulating tumour cells in patients with breast or ovarian cancer by molecular cytogenetics. *Br J Cancer* 1999; 81: 1165-1173.
- ¹⁰² Fox SB, Russell DL, Bliss J, Mansi JL, Gusterson B, Gatter KC et al. Association of tumor angiogenesis with bone marrow micrometastases in breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 1044-1049.
- ¹⁰³ Braun S, Schlimök G, Heumos I, Schaller G, Riethdorf L, Riethmüller G et al. erbB2 overexpression on occult metastatic cells in bone marrow predicts poor clinical outcome of stage I-III breast cancer patients. *Cancer Res* 2001; 61: 1890-1895.
- ¹⁰⁴ McDonnell CO, Hill ADK, McNamara TN, Walsh TN and Bouchier-Hayes DJ. Tumour micrometastases: the influence of angiogenesis. *Eur J Surg Oncol* 2000; 26: 105-115.
- ¹⁰⁵ Braun S and Pantel K. Biological characteristics of micrometastatic cancer cells in bone marrow. *Cancer and Metastases Reviews* 1999; 18: 75-90.
- ¹⁰⁶ Tórtola S, Steinert R, Hantschick M, Peinado MA, Gastinger I, Stosiek P et al. Discordance between K-ras mutations in bone marrow micrometastases and the primary tumor in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2001, 19: 2837-2843.
- ¹⁰⁷ Dietmaier W; Hartmann A, Wallinger S, Heinmoller E, Kerner T, Endl E et al. Multiple mutation analysis in single tumor cells with improved whole genome amplification. *Am J Pathol* 1999, 154: 83-95.
- ¹⁰⁸ Hermanek P. Disseminated tumor cells versus micrometastasis: definitions and problems. *Anticancer Research* 1999; 19: 2771-2774.
- ¹⁰⁹ Hermanek P, Hutter R, Sobin L, Wittekind C. Classification of isolated tumor cells and micrometastases. *Cancer* 1999, 86: 2668-2673.

-
- ¹¹⁰ Ravdin PM. The marker- positive/disease-negative breast cancer patient. In: Perry MC (ed). American Society of Clinical Oncology Educational Book 1997 (33rd Annual Meeting), Saunders Company, Orlando, p. 111-113.
- ¹¹¹ Bearman SI, Shpall EJ, Jones RB. High-dose chemotherapy with autologous hematopoietic progenitor cell support for metastatic and high risk primary breast cancer. *Semin Oncol* 1996, 23: 60-67.
- ¹¹² Peters W, Rosner G, Vredenburgh JJ, Shpall E, Crump M, Richardson P et al . A prospective, randomized comparison of two doses of combination alkylating agents as consolidation after CAF in high risk primary breast cancer involving ten or more axillary lymph nodes: preliminary results of CALGB 9082/SWOG 9114/NCIC MA-13. *Proc American Society of Clinical Oncology* 1999; 18: 1 a (abstr 2)
- ¹¹³ The Scandinavian Breast Cancer Study Group. Result from a randomized adjuvant breast cancer study with high dose chemotherapy with CTCb supported by autologous bone marrow stem cells versus dose escalated and tailored FEC therapy. *Proc American Society of Clinical Oncology* 1999; 18: 2 a (abstr 2)
- ¹¹⁴ Moss TJ, Ross A. The risk of tumor cell contamination in peripheral blood stem cell collections. *J Hematother* 1992; 1: 225-232.
- ¹¹⁵ Spyridonidis A, Bernhardt W, Fettscher S, Behringer D, Mertelsmann R, Henschler R. Minimal residual disease in autologous hematopoietic harvest from breast cancer patientes. *Ann Oncol* 1998; 9: 821-826.
- ¹¹⁶ Weaver CH, Moss T, Schwartzberg, Zhen B, West J, Rhinehart S et al. High-dose chemotherapy in patients with breast cancer: evaluation of infusing peripheral blood stem cells containing occult tumor cells. *Bone Marrow Transplant* 1998; 21: 1117-1124.
- ¹¹⁷ Cooper BW, Moss TJ, Ross AA, Ybañez J, Lazarus HM. Occult tumor contamination of hematopoietic stem-cells products does not affect clinical outcome of autologous transplantation in patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 1998; 16: 3509-3517.
- ¹¹⁸ Peddrizzoli P, Bataglia M, Da Prada GA, Lanza A, Cuomo A, Bertolini F et al. Role of tumor cells contaminating the graft in breast cancer recurrence after high dose chemotherapy. *Bone Marrow Transplant* 1997; 20: 167.
- ¹¹⁹ Solano C, Badia B, Lluch A, Marugan I, Benet I, Arbona C et al: Prognostic significance of the immunocytochemical detection of cantaminating tumor cells in apheresis products of patients with high-risk breast cancer treated with high-dose chemotherapy and stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2001; 27: 287-293.
- ¹²⁰ Brenner MK, Rill DR, Moen RC, Krance RA, Mirro JR J, Anderson WF et al. Gene marking to trace origin of relapse after autologous bone marrow transplantation. *Lancet* 1993; 341: 85.
- ¹²¹ Rill DR, Santama VM, Roberts WM, Nilson T, Bowman LC, Krance RA et al. Direct demonstration that autologous bone marrow transplantation for solid tumors can return a multiplicity of tumorigenic cells. *Blood* 1994; 84: 380
- ¹²² Braun S, Hepp F, Sommer H, Pantel K. Tumor-antigen heterogeneity of disseminated breast cancer cells: implications for immunotherapy of minimal residual disease. *Int J Cancer (Pred Oncol)* 1999; 84: 1-5.
- ¹²³ Maloney DG, Grillo-López AJ, White CA, Bodkin D, Schilder RJ, Neidhart JA et al. IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997; 90(6): 2188-2195.

-
- ¹²⁴ Coiffier B, Haioun C, Ketterer N, Engert A, Tilly H, Ma D et al. Rituximab (anti CD20 monoclonal antibody) for the treatment of patients with relapsing or refractory aggressive lymphoma: a multicenter phase II study. *Blood* 1998; 92 (6): 1927-1932.
- ¹²⁵ Riethmüller G, Schneider-Gädick E, Schlimok G, Schmiegel W, Raab R, Höffken K et al. Randomised trial of monoclonal antibody for adjuvant therapy of resected Dukes' C colorectal carcinoma. *Lancet* 1994; 343: 1177-1183.
- ¹²⁶ Riethmüller G, Holz E, Schlimok G, Schmiegel W, Raab R, Höffken K et al. Monoclonal antibody therapy for resected Dukes' C colorectal cancer: seven year outcome of a multicenter randomized trial. *J Clin Oncol* 1998; 16: 1788-1794.
- ¹²⁷ Baselga J, Tripathy D, Mendelson J, Baughman S, Benz CC, Dantis L et al. Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 1996; 14: 737-744.
- ¹²⁸ Braun S, Hepp F, Kentenich C, Janni W, Pantel K, Riethmüller G, Willgeroth F and Sommer H. Monoclonal antibody therapy with edrecolomab in breast cancer patients: monitoring of elimination of disseminated cytokeatin-positive tumor cells in bone marrow. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 3999-4004.
- ¹²⁹ Putz E, Witter K, Offner S, Stosiek P, Zippelius A, Johnson J et al. Phenotypic characteristics of cell lines derived from disseminated cancer cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors: establishment of working models for human micrometastases. *Cancer Res* 1999; 59: 241-248.
- ¹³⁰ Diel IJ, Solomayer EF, Costa SD, Gollan C, Wallviener D, Kaufmann M et al. Reduction in new metastases in breast cancer with adjuvant clodronate treatment. *N Eng J Med* 1998; 339: 357-363
- ¹³¹ Saarto T, Blomqvist C, Virkkunen P, Elomaa I. Adjuvant clodronate treatment does not reduce the frequency of skeletal metastases in node-positive breast cancer patients: 5-year results of a randomized controlled trial. *J Clin Oncol* 2001; 19: 10-17.
- ¹³² Peterson AH. The potential role of biphosphonates as adjuvant therapy in the prevention of bone metastases. *Cancer* 2000; 88 (S12): 3038-3046.
- ¹³³ Longo D. Tumor markers: current status of the quest-Introductory overview. *Semin Oncol* 1987; 14: 85-88.
- ¹³⁴ Hayes DF, Kaplan W. Evaluation of patients after primary therapy. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Hellman S (eds): *Diseases of the breast*. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia 1999.
- ¹³⁵ Blayney DW. Management of the tumor marker-positive, disease negative- patient. In: Perry MC (ed). *American Society of Clinical Oncology Educational Book 1997 (33rd Annual Meeting)*, Saunders Company, Orlando, p. 100-101.
- ¹³⁶ American Society of Clinical Oncology. Clinical practice guidelines of the use of tumor markers in breast and colorectal cancer. *J Clin Oncol* 1996; 14: 2843-2877.
- ¹³⁷ Bast RC, Jr, Ravdin P, Hayes DE, Bates S, Fritsche H, Jessup JM et al. 2000 Update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: Clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 2001; 19: 1865-1878

¹³⁸ Vizcarra E, Lluch A, Cibrian R, Jarque F, García-Conde J. CA 15.3, CEA and TPA tumor markers in the early diagnosis of breast cancer relapse. *Oncology* 1994; 51: 491-496.

¹³⁹ Vizcarra E, Lluch A, Cibrian R, Jarque F, Alberola V, Belloch V et al. Value of CA 15.3 in breast cancer and comparison with CEA and TPA: a study of specificity in disease-free follow-up patients and sensitivity in patients at diagnosis of the first metastasis. *Breast Cancer Res Treat* 1996; 37: 209-216.

¹⁴⁰ Braun S, Pantel K. Clinical significance of occult metastatic cells in bone marrow of breast cancer patients. *The oncologist* 2001; 6: 125-132.

¹⁴¹ Kamby C, Guldhammer B, Vejborg I, Rossing N, Dirksen H, Daugaard S et al. The presence of tumor cells in bone marrow at the time of first recurrence of breast cancer. *Cancer* 1987; 60: 1306-1312.