



Papel del Laboratorio en el estudio del cáncer de mama

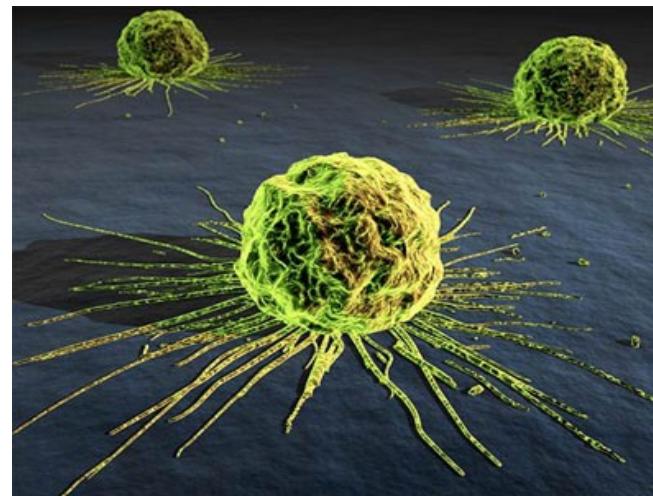
Luis Sáenz Mateos

R-2 Análisis Clínicos

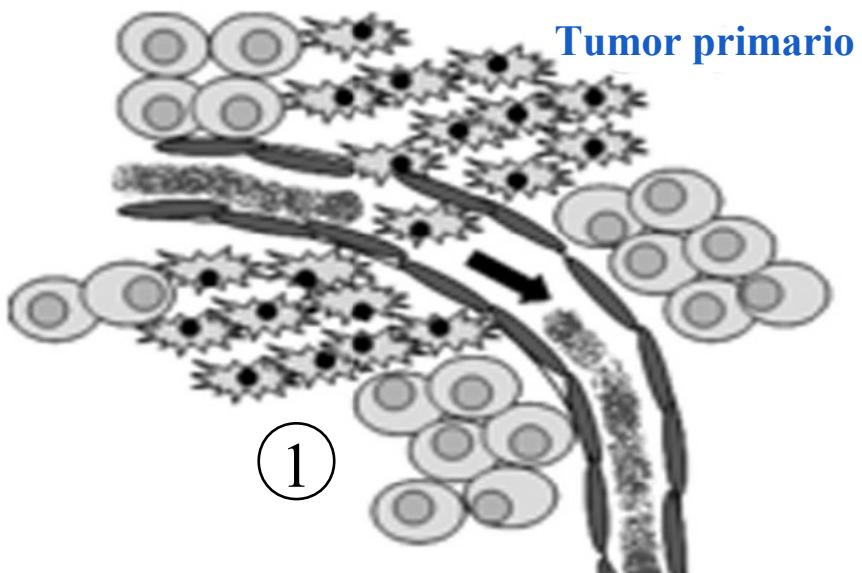


Cáncer

- El cáncer esporádico surge principalmente a partir de mutaciones en células somáticas y es el resultado de un desarreglo genético acumulado a través del tiempo.



Proceso metastásico

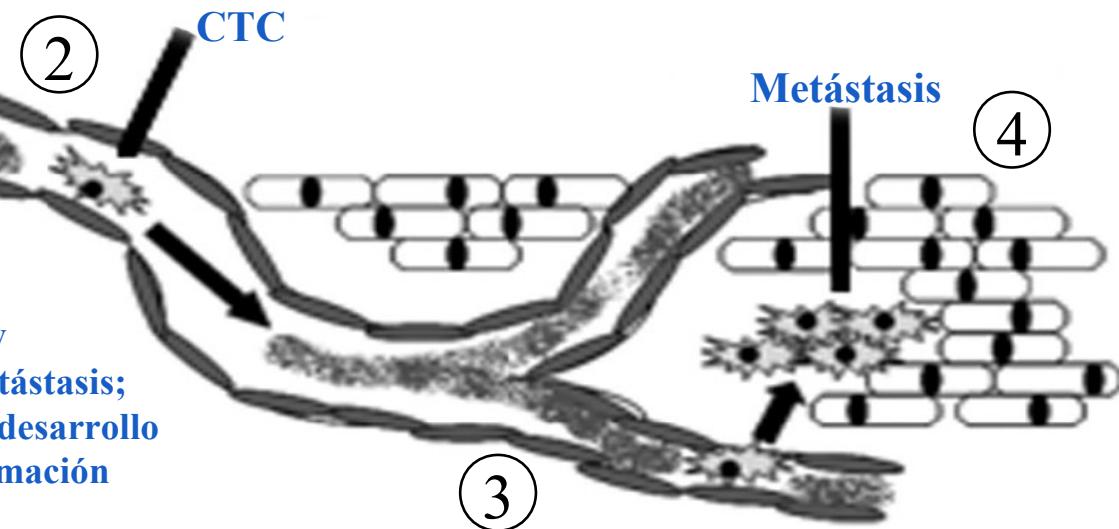


1- A medida que el tumor primario crece, requiere un suministro de sangre que le permita afrontar sus necesidades metabólicas (angiogénesis).

2- La formación de nuevos vasos sanguíneos también provee una ruta de escape, en la que las células pueden abandonar el tumor y entrar en el sistema circulatorio (intravasación) o pueden ingresar indirectamente vía sistema linfático.

3- Las células tumorales sobreviven en la circulación hasta que puedan detenerse en un nuevo órgano, abandonan el vaso e ingresan al tejido circundante (extravasación).

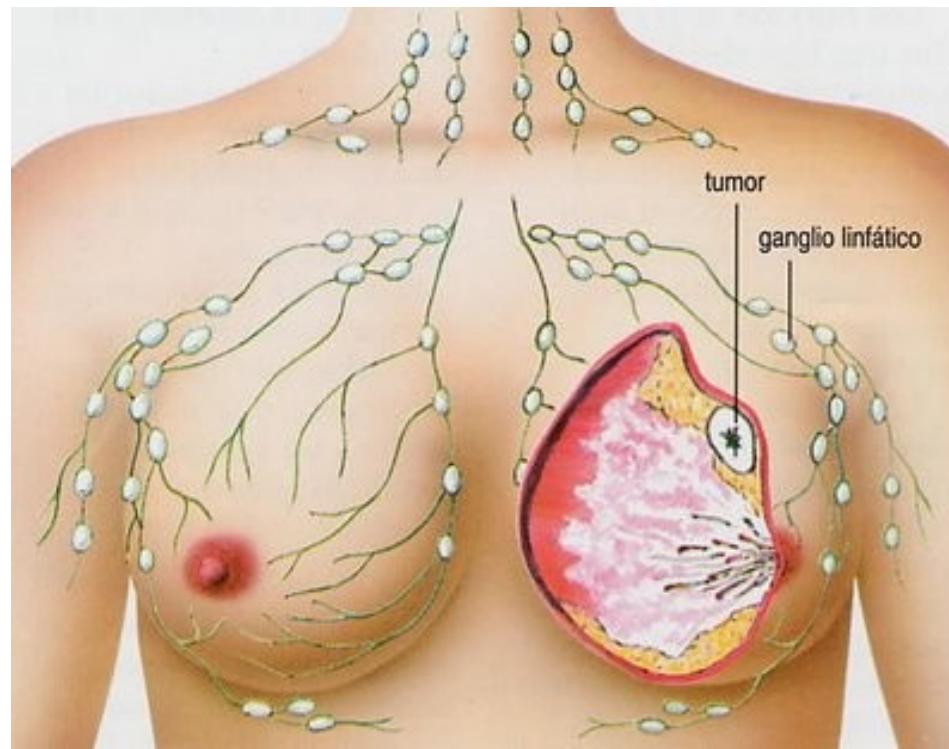
4- Una vez en el nuevo sitio, las células inician y mantienen el crecimiento para formar micrometástasis; este crecimiento debe ser sostenido mediante el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos, que permiten la formación de un tumor macroscópico (tumor secundario).





Cáncer de mama

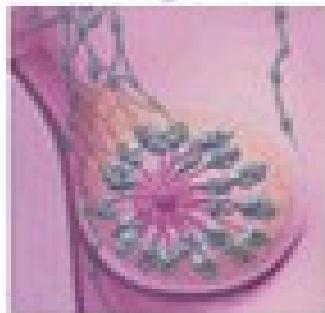
- El cáncer de mama consiste en un crecimiento anormal y desordenado de las células de éste tejido.



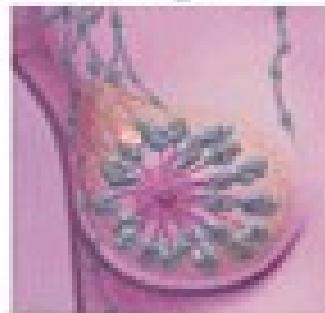
Estadíos

Papel del Laboratorio

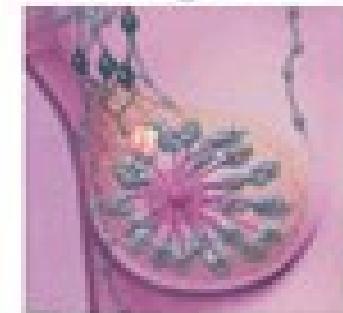
Stage 0



Stage I



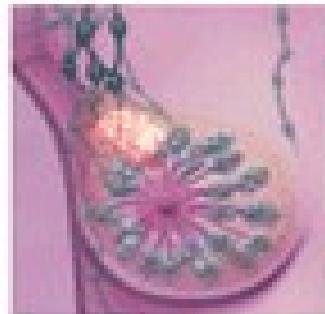
Stage II



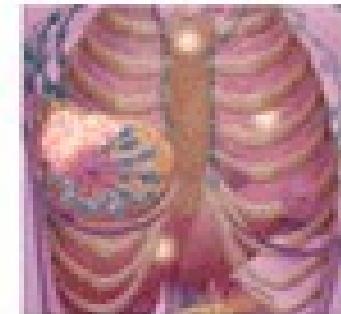
Stage IIIA



Stage IIIB/C



Stage IV





Clasificación

El **carcinoma ductal in situ** se origina en las células de las paredes de los conductos mamarios. Es un cáncer muy localizado, que no se ha extendido a otras zonas ni ha producido metástasis. Por este motivo esta enfermedad 'premaligna' puede extirparse fácilmente. La tasa de curación ronda el 100%. Este tipo de tumor se puede detectar a través de una mamografía.

El **carcinoma ductal infiltrante** (o invasivo) es el que se inicia en el conducto mamario pero logra atravesarlo y pasa al tejido adiposo de la mama y luego puede extenderse a otras partes del cuerpo. Es el más frecuente de los carcinomas de mama, se da en el 80% de los casos.

El **carcinoma lobular in situ** se origina en las glándulas mamarias (o lóbulos) y, no es un verdadero cáncer, aumenta el riesgo de que la mujer pueda desarrollar un tumor en el futuro. Se suele dar antes de la menopausia. Una vez que es detectado, es importante que la mujer se realice una mamografía de control al año y varios exámenes clínicos para vigilar el posible desarrollo de cáncer.

El **carcinoma lobular infiltrante** (o invasivo) comienza en las glándulas mamarias pero se puede extender y destruir otros tejidos del cuerpo. Entre el 10% y el 15% de los tumores de mama son de este tipo. Este carcinoma es más difícil de detectar a través de una mamografía.

El **carcinoma inflamatorio** (poco común, 1% del total de los tumores cancerosos de la mama). Es agresivo y de rápido crecimiento. Hace enrojecer la piel del seno y aumentar su temperatura. La apariencia de la piel se vuelve gruesa y ahuecada, como la de una naranja, y pueden aparecer arrugas y protuberancias. Estos síntomas se deben al bloqueo que producen las células cancerosas sobre los vasos linfáticos.



Factores de riesgo

- Sexo
- Edad
- Genes BRCA1, BRCA2 y Her2/neu
- Antecedentes familiares
- Antecedentes personales (tumor benigno previo)
- Raza
- Períodos menstruales
- Embarazo después de los 30 años
- Alcohol
- Exceso de peso



Diagnóstico

- Autoexploración
- Mamografía
- Ecografía
- Resonancia magnética nuclear
- TAC
- PET
- Termografía
- Biopsia



Tratamiento

- Intervención quirúrgica.
- Radioterapia y quimioterapia.
- Terapia hormonal.

Fármacos antiestrógenos o moduladores del receptor estrogénico.

Agonistas de la hormona luteinizante, a nivel de la hipófisis, que se encarga de la producción de estrógenos en mujeres premenopáusicas.

Fármacos de la aromatasa, enzima que produce estrógenos en mujeres cuyos ovarios ya no los producen, es decir, en mujeres menopáusicas.

Fármacos de tipo de la progesterona.



Papel del Laboratorio

- Microarrays
- Detección de células circulantes
- Marcadores serológicos
- RT-PCR Ganglio centinela



Papel del Laboratorio

Microarrays

- Mama-print
 - Chip del diagnóstico molecular del cáncer de mama.
 - Chip de 70 genes
 - Genes proliferativos
 - Genes supresores de tumores
 - Según perfil genético
 - Remisión
 - Recidiva
- Permite separar pacientes con tumores con alta capacidad de proliferación ayudando a pronosticar la evolución de la enfermedad y elección del tratamiento.



Papel del Laboratorio

Detección de células circulantes

- Durante décadas se consideró que las células del cáncer de mama diseminadas alcanzaban en primer lugar los nódulos o ganglios linfáticos, antes de dirigirse a la sangre periférica y a localizaciones distantes, como la médula ósea.
- 30% de las pacientes sin enfermedad detectable en los nódulos linfáticos desarrolla metástasis distantes dentro de los 5 años siguientes al diagnóstico.
- Las CTC ya aparecen en los estadios tempranos del carcinoma mamario, antes del desarrollo de metástasis, y pueden ser detectadas, en la mayoría de las pacientes, en el momento del diagnóstico de carcinoma mamario.



Papel del Laboratorio

Detección de células circulantes

- Inconvenientes Anatomía patológica
 - Pacientes con nódulos linfáticos negativos → desarrollan metástasis
 - Métodos histológicos complejos, laboriosos y no permiten detectar pequeñas cantidades de células tumorales.
 - Necesidad de experiencia
- Ventajas de la detección de CTC en sangre periférica
 - Toma de muestra simple y se puede realizar de forma reiterada.
 - Presencia de CTC en sangre en fase temprana del cáncer sin metástasis.
 - Técnicas:
 - RT-PCR
 - Cell Tracks Veridex
 - Inconveniente: Número de CTC muy bajo (incluso en metástasis) comparado con el número de células que le rodean
 - Gradiientes de densidad (Percoll o Ficoll) permiten la separación de células mononucleares de la sangre que contienen la mayor fracción de CTC.



Papel del Laboratorio

Detección de células circulantes

- RT-PCR: detección de secuencias de ácidos nucleicos que codifican genes específicos de la célula tumoral.
 - ADN libre en sangre circulante. Desventajas:
 - Variabilidad genética entre tumores.
 - Origen del ADN libre desconocido (¿CTC, tumores primarios, Metastásicos o tejido normal?)
 - ARNm de las CTC específicos del Cáncer de mama.
 - Gran sensibilidad
 - Permite detectar pequeñas cantidades de moléculas de ARNm específicas de células tumorales entre la totalidad de los ARNm de un tejido o células. Esto indica diseminación del tumor.
 - Se consigue detectar 1 CTC entre 10^7 células nucleadas de sangre periférica.
 - Desventajas: ARN es más inestable que el ADN, (ribonucleasas sanguíneas).



Papel del Laboratorio

RT-PCR

■ Marcadores (oligos)

- | | |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none">■ Citoqueratinas (CK19, y CK20)■ Antígeno carnoembrionario■ CA 15.3■ Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R)■ erbB-2■ MUC-1 | Sensibilidad/Especificidad
Insuficiente |
|--|--|

- | | |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none">■ Maspina■ Mamoglobina | Sensibilidad/Especificidad
Idónea |
|---|--|



Papel del Laboratorio

RT-PCR - Maspina

- Proteína relacionada con la familia serpina de inhibidores de la proteasa.
- Interacciona con el colágeno tipo I y tipo III, realizando una acción anti-angiogénica en la matriz extracelular.
- Aparece en determinados tipos celulares: células mioepiteliales en mama, células basales de próstata, epitelio glandular y de mucosa en tracto gastrointestinal y capas epidérmicas de la piel.
- Marcador principalmente asociado al tejido epitelial siendo de utilidad como marcador sensible y específico para la detección de células ocultas de cáncer de mama.
- No se detecta en sangre periférica ni en médula ósea de personas sanas ni en pacientes con neoplasias hematológicas.
- Inconveniente: su expresión puede ser dependiente de citoquinas, pudiéndose detectar en un porcentaje mínimo de pacientes con trastornos hemáticos/inflamatorios → Falsos positivos.



Papel del Laboratorio

RT-PCR - Mamoglobina

- Familia secretoglobinas SGGB, implicadas en el desarrollo del cáncer, en la señalización, en la regulación del sistema inmunitario, en la quimiotaxis y en el transporte de moléculas aromáticas como hormonas esteroides y bifenilos.
- Codificada en cromosoma 11, pm 10.5 kD (proteína madura 8.5 kD).
- Función desconocida aunque se asocia con la proliferación de la glándula mamaria y la diferenciación terminal.
- Su expresión es altamente específica del epitelio mamario normal y neoplásico, y se utiliza para detectar células tumorales circulantes.
- No se expresa:
 - Sangre periférica.
 - Células progenitoras de sangre periférica o de médula ósea de donantes sanos.
 - Tumores hemáticos o células progenitoras de sangre periférica de pacientes con tumores hemáticos.
 - Ni tumores sólidos diferentes del carcinoma mamario



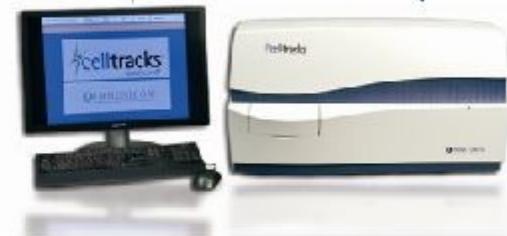
Papel del Laboratorio Cell Tracks Veridex



Tubo con
preservante celular



Análisis molecular



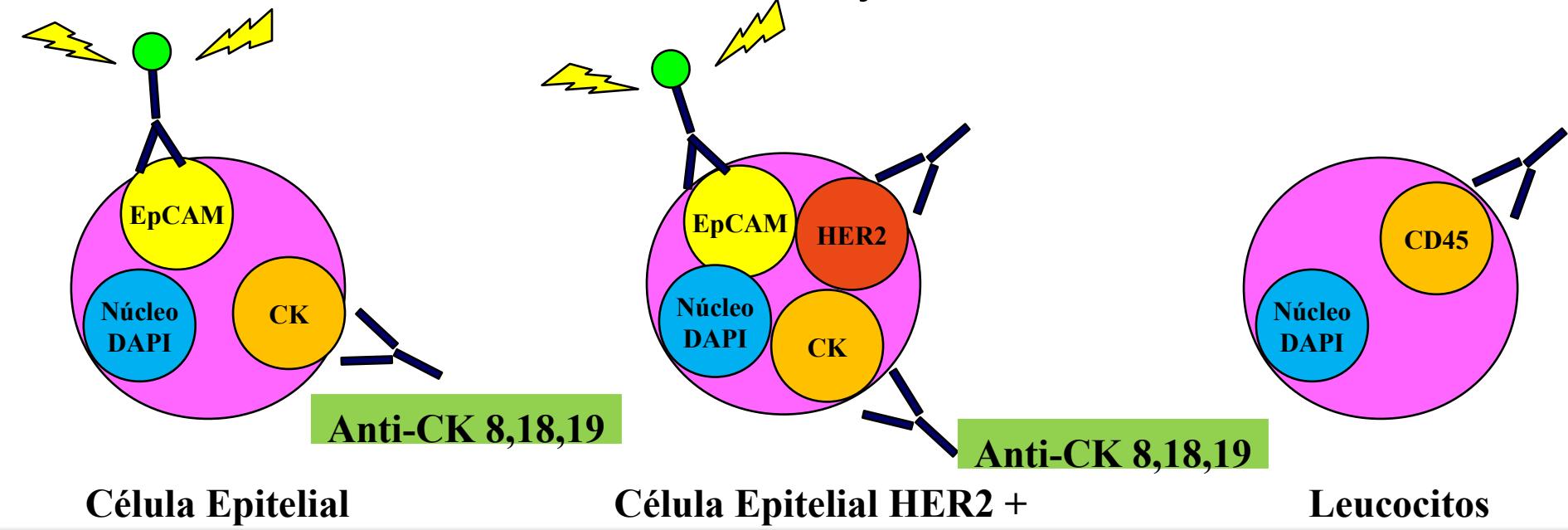
Análisis y cuantificación
microscópica

- Metodología analítica: extracción inmunomagnética y análisis citométrico.



Papel del Laboratorio Cell Tracks Veridex

- Seleccionamos las células epiteliales con marcador específico con imán.
- Marcamos las que tengan núcleo con DAPI.
- Marcamos leucocitos con anti-CD45.
- Marcamos las tumorales con CK y anti-HER2.

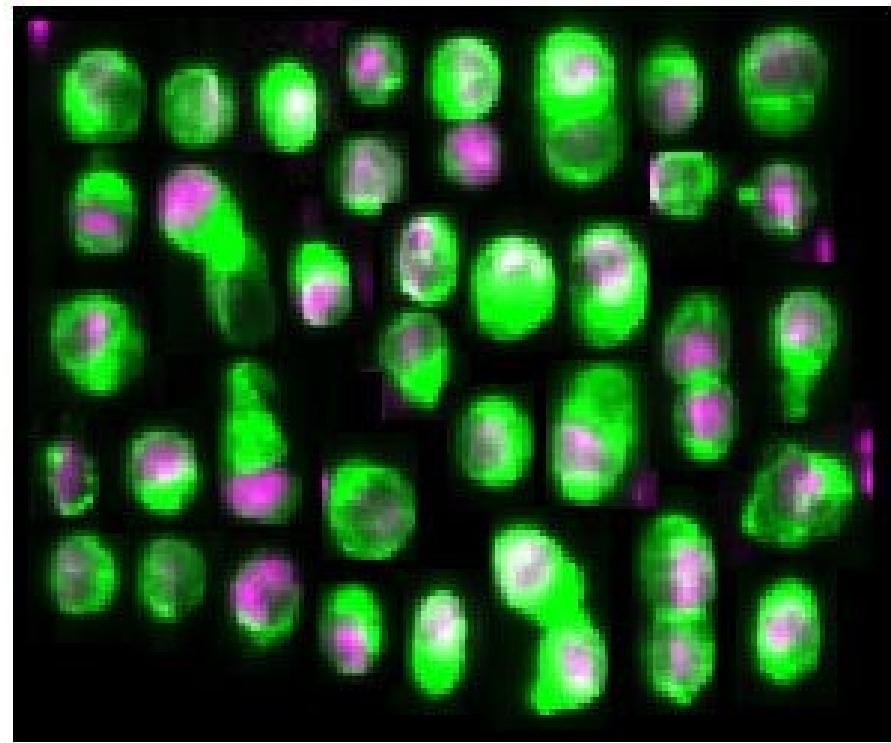
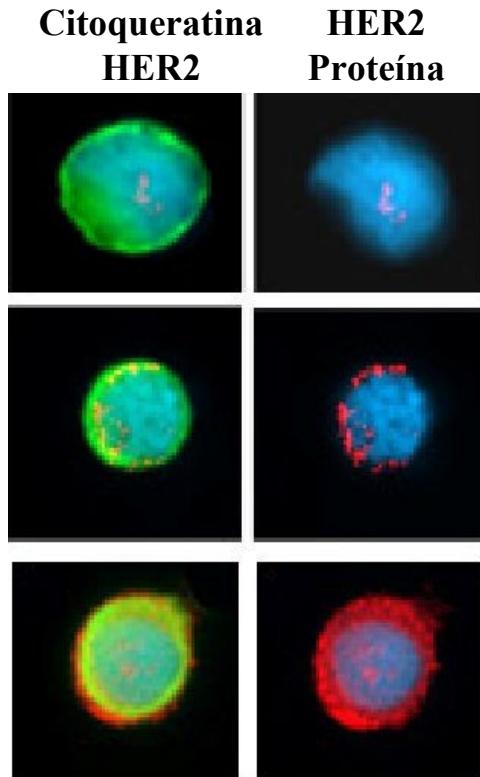




Papel del Laboratorio

Cell Tracks Veridex

- El objetivo determinando el número de CTC/mL es:
 - Evidenciar el proceso metastásico
 - Servir como seguimiento de la respuesta terapéutica





Papel del Laboratorio

Marcadores serológicos

Clase	Tipo	Marcadores	Marcador*	Tumor asociado	Falsos positivos
Derivados del tumor	Antígenos oncofetales	AFP, CEA	AFP	Hígado; Testículo; Seno endodérmico	Hepatopatías
	Antígenos oncoplacentarios	β -hCG, SP-1	CEA	Neoplasias epiteliales	Hepatopatías; Insuficiencia renal; EPOC
	Antígenos tisulares	PSA, PSA-libre, SCC, S100, Pro-GRP, MIA	β -hCG	Tumores trofoblásticos; Testículo	Embarazo
	Hormonas ectópicas	ACTH, PTH, Calcitonina	Calcitonina	Carcinoma medular de tiroides	Insuficiencia renal
	Mucinas	CA 125, CA 19.9, CA 15.3	Tiroglobulina	Carcinoma papilar y folicular de tiroides	Tiroiditis; Embarazo
	Enzimas	NSE, GGT, FA	CA 125	Ovario; Endometrio; Pulmón	Derrames serosos; Insuficiencia renal; Endometriosis
	Inmunoglobulinas	Componentes monoclonales	CA 19.9	Páncreas; Estómago; Colon y recto; Ovario	Ictericia; Insuficiencia renal
	Proteínas oncogénicas	HER-2/neu, TP53	CA 15.3	Mama; Ovario	Hepatopatías; Insuficiencia renal
Asociados al tumor	Proteínas de fase aguda	PCR, Ferritina	CA 72.4	Colon y recto; Páncreas; Ovario; Estómago	Hepatopatías; Insuficiencia renal
	Moduladores sistema inmune	Citocinas	CYFRA 21-1	Neoplasias epiteliales	Hepatopatías
↑			PSA	Próstata	Prostatitis; Hiperplasia benigna de próstata
Marcadores tradicionales			NSE	Pulmón células pequeñas; Carcinoide; Wilms	Hemólisis; Insuficiencia renal
→			SCC	Carcinomas epidermoides	Insuficiencia renal; Eccemas; Pénfigo
Marcadores tumorales utilizados en el laboratorio clínico			HER2/neu	Mama; Ovario; Próstata; Pulmón	Hepatopatías.
			5-HIAA	Carcinoide	Factores alimentarios; (plátanos, piña, café, etc.)



Papel del Laboratorio

Marcadores serológicos

- No sirven para el diagnóstico.
- Los Antígenos mucínicos (MUC-1) están siendo los más usados, pero que su empleo simultaneo no aporta información adicional porque tienen similar sensibilidad y especificidad.
- Recomendación de utilizar MUC-1 y CEA simultáneamente (EGTM Breast Cancer Guideline).
- La determinación de CEA ofrece información adicional al CA.15.3
- CEA tiene **valor pronóstico antes de la operación** para la remoción del tumor
 - Valores altos de CEA en suero o en ganglio positivo antes de la operación suponen un alto riesgo de recidiva.



Papel del Laboratorio

Ganglio centinela-Concepto

- Es el primer ganglio que recibe el drenaje linfático desde un tumor primario.
- De contener metástasis indica la posibilidad de que otros ganglios la contengan también.
- Puede haber más de un ganglio centinela.
- La mayor parte suelen estar en Nivel I



Papel del Laboratorio Ganglio centinela

- Localización
 - Inyección de TC99
 - Gammagrafía planar
 - Spect-Tac
 - Gammagrafía intraoperatoria
 - Localización con sonda
- Biopsia negativa evita la linfadenectomía axilar.
- Su estudio en el laboratorio solo tiene sentido en el estadío I y II.



Papel del Laboratorio Ganglio centinela

- Estudio en Anatomía patológica:
 - Se realizan varias secciones del ganglio.
 - Se tiñe con hematoxilina-eosina y se observa al microscopio.
 - 100% Sensibilidad y Especificidad en la identificación de metástasis (no micrometástasis).
 - Estudio inmunohistoquímica (tinción para CK 19).
 - Incrementa un 10-20% la detección de metástasis axilares complementando la H-E.
- Inconvenientes: resultados subjetivos en función del número de cortes histológicos realizados y la experiencia del patólogo.



Papel del Laboratorio Ganglio centinela

- Estudio en Análisis Clínicos:
 - Cortes seriados del ganglio.
 - Extracción ARN (20 minutos).
 - RT-PCR:
 - Mamoglobina.
 - CK-19.
 - Porfobilinógeno deaminasa PBGD (Control).
- Siendo el control +, y un solo marcador +, el ganglio es positivo (metástasis).



Papel del Laboratorio Ganglio centinela

- Ventajas RT-PCR en el estudio del Ganglio centinela:
 - Alta sensibilidad y especificidad diagnósticas
 - Alta reproducibilidad
 - Rapidez (uso intraoperatorio)
 - Alto grado de automatización (método OSNA)
 - Eficiencia coste/efectividad (evita re-intervenciones).
 - Confortabilidad para el paciente (evita re-intervenciones).



Papel del Laboratorio Ganglio centinela

- Estudio realizado en 144 ganglios (103 pacientes).
 - Hematoxilina-Eosina (intraoperatoria).
 - RT-PCR (Viridex intraoperatoria)

Técnica	Pacientes negativo en ambas técnicas	Pacientes positivo en ambas técnicas	Pacientes positivo RT-PCR	Pacientes positivo H&E
H&E	122 (84,7%)	13 (9.0%)	-	1 (0.8%)
RT-PCR	122 (84,7%)	13 (9.0%)	8 (5.5%)	-



Papel del Laboratorio Ganglio centinela

- Estudio realizado en 369 ganglios por PCR.

MG+ CK+	MG+ CK-	MG- CK+	MG- CK-
33	29	7	300
69 Ganglios positivos			-



Conclusiones

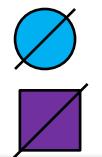
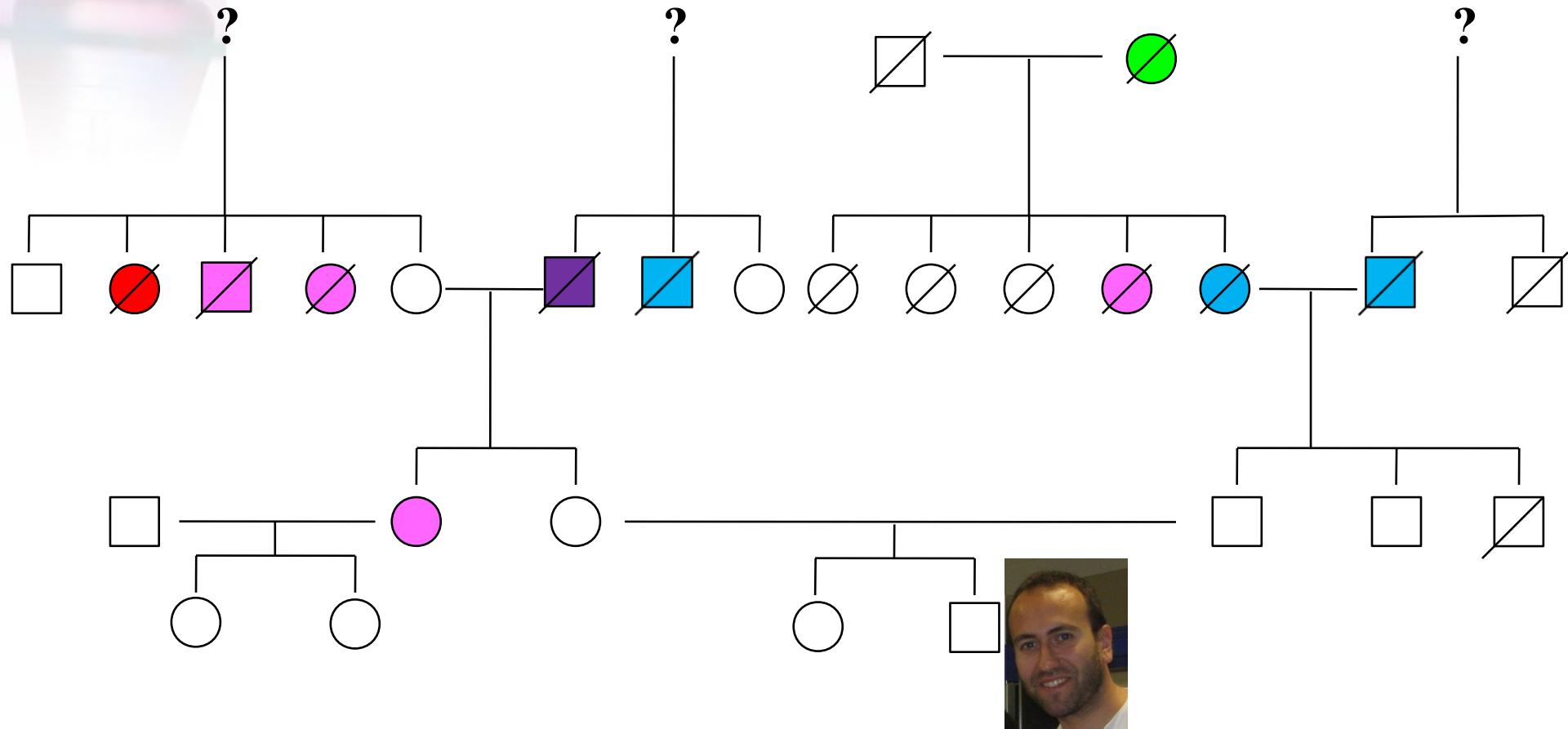
- Se detecta pacientes con cáncer de mama y ganglios “negativos” que se van a beneficiar de un tratamiento sistémico.
- Se aumenta en un 4.5% la “positividad” del ganglio centinela por PCR intraoperatoria.
- Los valores de CEA en suero en pacientes con cáncer de mama son útiles para establecer el riesgo de recidiva.
- El método Cell Tracks Veridex es una técnica muy útil para la identificación de CTC en ausencia de metástasis y para el seguimiento de la respuesta terapéutica.



Conclusiones

- Alrededor de un 30% de pacientes sin enfermedad detectable en los nódulos linfáticos en el momento del diagnóstico pueden desarrollar metástasis distantes y recaer en la enfermedad. La detección de CTC mediante RT-PCR de los genes Mamoglobina y Maspina podría utilizarse para evaluar la progresión de la enfermedad, así como para identificar, pacientes que, a pesar del tratamiento, tienen un mayor riesgo de recurrencia o mayor probabilidad de desarrollar un tumor secundario y que, por lo tanto, deberían continuar con una terapia adyuvante más agresiva.

Árbol genealógico



Cáncer indeterminado



Cáncer de Próstata



Cáncer de estómago



Cáncer de mama



Cáncer de pulmón



Muchas Gracias



Ánimo Tita!!!!!!

