

Cristina Vallejo Bernad

RESPUESTA BIOLÓGICA EN
PACIENTES CON CÁNCER DE
MAMA TRATADAS CON
RADIOTERAPIA
INTRAOPERATORIA

Departamento
Cirugía, Obstetricia y Ginecología

Director/es
Casamayor Franco, M. Carmen

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

RESPUESTA BIOLÓGICA EN PACIENTES CON
CÁNCER DE MAMA TRATADAS CON
RADIOTERAPIA INTRAOPERATORIA

Autor

Cristina Vallejo Bernad

Director/es

Casamayor Franco, M. Carmen

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Cirugía, Obstetricia y Ginecología

2020

“ RESPUESTA BIOLÓGICA EN PACIENTES CON
CÁNCER DE MAMA TRATADAS CON
RADIOTERAPIA INTRAOPERATORIA”

CRISTINA VALLEJO BERNAD



Directora

Carmen Casamayor Franco

TESIS DOCTORAL 2020

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

FACULTAD DE MEDICINA



UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Departamento de Cirugía, Obstetricia y Ginecología

Dña M CARMEN CASAMAYOR FRANCO, Doctor en Medicina y Cirugía, Profesor asociado de la Universidad y Facultativo especialista de Área de la Unidad de Cirugía Endocrina, Bariátrica y mama del Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza.

CERTIFICA:

Que D^a CRISTINA VALLEJO BERNAD, licenciado en Medicina y Cirugía, especialista en Cirugía General, ha realizado bajo mi dirección el trabajo que les presenta como memoria para optar al grado de Doctor, con el título: "RESPUESTA BIOLÓGICA EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA TRATADAS CON RADIOTERAPIA INTRAOPERATORIA"

Después de su revisión, considero que reúne los requisitos exigidos por la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza para ser considerada como Tesis Doctoral y defendida en sesión pública ante el tribunal que le sea asignado para juzgarla.

Zaragoza, 3 de marzo de 2020

Fdo. Dr. Carmen Casamayor Franco

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Casamayor, Menchu, quién plantó la semilla de este proyecto y ha sido la artífice principal de que se haya llevado a cabo gracias a su esfuerzo, entusiasmo y su idea de que nada es imposible, tan fuerte que consigue contagiarte.

A los compañeros de los Servicios de Cirugía del Hospital Clínico y del Hospital de Barbastro, especialmente, al Dr. Güemes, a Jesús, Yaiza y Aurora, por su labor generosa, desinteresada y buen hacer en esta investigación.

A Ana Belén y Juan, nuestros bioquímicos, por su trabajo y por ser el enlace de todos.

A los especialistas de la Unidad de Mama del Hospital Universitario Miguel Servet por su apoyo e interés en este proyecto.

A todos los miembros del Servicio de Cirugía General del Hospital Universitario Miguel Servet. A las enfermeras y auxiliares, por estar siempre pendientes de que no se perdiera ni una sola muestra. A mis queridos residentes, mi familia, los que ayudan en lo que haga falta, sin necesidad de pedirlo. Y a todos los adjuntos, por haberme enseñado no solo un oficio, si no un estilo de vida, el de ser cirujano.

Y, por supuesto, a los de siempre, a mi familia y amigos, y, especialmente, a los que son la causa de lo que soy. A mis abuelos, por transmitirme esa ilusión tan sincera con cada logro, que te llena de fuerza para acometer el siguiente desafío. A mis padres, quienes me han brindado todas las oportunidades de desarrollo posible, enseñándome la importancia del esfuerzo y han sido un apoyo fundamental en todas las metas que me he propuesto. Y a mi hermana, Gloria, no solo por tu indispensable ayuda final en este proyecto, cuando parecía que no terminaba nunca, si no por tu ayuda siempre, por volvernos a ver una y otra vez, y hacerme recordar la parte bonita de vivir.

Índice

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	SITUACIÓN ACTUAL DEL CÁNCER DE MAMA	3
1.2	ANATOMÍA QUIRÚRGICA DE LA MAMA.....	5
1.3	MANEJO DEL CÁNCER DE MAMA.....	8
1.3.1	Generalidades	8
1.3.2	Factores de riesgo	9
1.3.3	Diagnóstico.....	10
1.3.4	Clasificación.....	19
1.3.5	Tratamiento.....	27
1.4	SISTEMA INMUNOLÓGICO	41
1.4.1	Generalidades	41
1.4.2	Sistema inmune innato	41
1.4.3	Sistema inmune adaptativo	42
1.5	SISTEMA INMUNOLÓGICO FRENTE AL CÁNCER	44
1.5.1	Generalidades	44
1.5.2	La teoría de las tres E	45
1.5.3	Mecanismos de escape del tumor	46
1.5.4	Invasión y Metástasis	50
1.5.5	Inflamación y cáncer	51
1.6	EL MICROAMBIENTE TUMORAL DESPUÉS DE LA RADIOTERAPIA	52
1.6.1	Generalidades	52
1.6.2	Las 6 Rs de la radiobiología	53
1.6.3	Efectos de la radioterapia en el microambiente tumoral	54
1.7	LA RIO EN EL ESTUDIO DEL MICROAMBIENTE TUMORAL.....	59
1.7.1	Generalidades	59
1.7.2	Efectos de la RIO en el microambiente tumoral	60
2.	OBJETIVOS.....	67
2.1	JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	69
2.2	HIPÓTESIS DE TRABAJO	70
2.3	OBJETIVO DEL ESTUDIO.....	70
2.3.1	Objetivo principal	70
2.3.1	Objetivo secundario	70
3.	MATERIAL Y MÉTODOS	71

3.1	DISEÑO DEL ESTUDIO	73
3.2	MUESTRA.....	73
3.2.1	Población objeto de estudio	73
3.2.2	Criterios de inclusión	74
3.2.3	Criterios de exclusión	75
3.2.4	Cumplimiento de normas éticas	76
3.3	PROCEDIMIENTOS	76
3.3.1	Formularios	76
3.3.2	Tratamiento de radioterapia	77
3.3.3	Inmunodetección de proteínas	77
3.3.4	Valoración de fibrosis.....	78
3.4	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	78
3.4.1	Cálculo de tamaño muestral	78
3.4.2	Análisis de los resultados	79
4.	RESULTADOS	81
4.1	DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA CASUÍSTICA.....	83
4.1.2	Características diagnósticas del cáncer de mama.....	84
4.1.3	Características de la intervención quirúrgica	89
4.1.4	Características del estudio anatomopatológico.....	91
4.1.5	Características moleculares e inmunohistoquímicas.....	95
4.1.6	Inmunodetección de proteínas	96
4.2	ANÁLISIS BIVARIANTE.....	97
4.3	ANÁLISIS MULTIVARIANTE	100
4.3.1	Comparación suero preoperatorio y a las 24 horas desde la cirugía.....	100
4.3.2	Comparación drenaje a las 6 y 24 horas desde la cirugía	112
4.3.3	Comparación suero y drenaje a las 24 horas desde la cirugía	124
4.4	VALORACIÓN DE FIBROSIS	136
5.	DISCUSIÓN.....	141
5.1	VALIDEZ DEL ESTUDIO	146
5.1.1	Selección de la muestra.....	146
5.1.2	Inmunodetección de proteínas	147
5.1.3	Tamaño muestral	147
5.2	DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA CASUÍSTICA.....	148
5.3	RESPUESTA BIOLÓGICA DEL SISTEMA INMUNOLÓGICO.....	149

5.3.1	IL6 e IL8.....	149
5.3.2	CXCL10.....	150
5.3.3	IL1 β y TNF- α	151
5.3.4	TGF- β	152
5.4	VALORACIÓN DE FIBROSIS	153
5.5	LIMITACIONES DEL ESTUDIO	155
5.6	FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN	156
6.	CONCLUSIONES	159
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	163
8.	ANEXOS	185
8.1	ANEXO I	187
8.2	ANEXO II	193
8.3	ANEXO III	194
8.4	ANEXO IV	195

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Mortalidad por cáncer en España en 2014.....	3
Figura 2: Incidencia por cáncer en la mujer en España en 2015.	4
Figura 3: Ganglios linfáticos.....	6
Figura 4: BIRADS® léxico mamográfico.....	12
Figura 5: Masa irregular en mamografía.....	13
Figura 6: Calcificaciones sospechosas de malignidad en mamografía.	13
Figura 7: BIRADS® léxico ecográfico.....	14
Figura 8: Masa en ecografía.	15
Figura 9: CDI.....	20
Figura 10: CLI.....	21
Figura 11: Carcinoma tubular.....	21
Figura 12: Carcinoma mucinoso.....	21
Figura 13: Carcinoma medular.....	22
Figura 14: Tratamiento del cáncer de mama en estadíos iniciales.....	29
Figura 15: Técnica de localización mediante arpón.	31
Figura 16: Linfadenectomía axilar.	33
Figura 17: Algoritmo cirugía de la mama.....	34
Figura 18: Primer intento de tratamiento con rayos X.....	35
Figura 19: Indicaciones irradiación parcial.....	37
Figura 20: Administración de RIO.....	38
Figura 21: Efectos locales y sistémicos de algunas interleuquinas.	42
Figura 22: Mecanismos de escape tumoral.	46
Figura 23: Infiltrado celular en el microambiente tumoral.....	50
Figura 24: Efecto de vecindad (bystander) y efecto de vecindad de largo alcance (abscopal)..	56
Figura 25: Proteínas del fluido de la herida quirúrgica alteradas por la RIO.....	62
Figura 26: Lateralidad tumoral.	86
Figura 27: Localización tumoral controles.....	87
Figura 28: Localización tumoral casos.....	87
Figura 29: Clasificación TNM Controles.....	92
Figura 30: Clasificación TNM Casos.	93
Figura 31: Estadio.....	93
Figura 32: IL6 suero preoperatorio-24 horas.....	101
Figura 33: CXCL10 suero preoperatorio-24 horas.	103
Figura 34: IL8 suero preoperatorio-24 horas.....	105
Figura 35: IL1 β suero preoperatorio-24 horas.....	107
Figura 36: TNF- α suero preoperatorio-24 horas.....	109
Figura 37: TGF- β suero preoperatorio-24 horas.....	110
Figura 38: TGF- β suero preoperatorio-24 horas boxplot.....	111
Figura 39: IL6 drenaje 6-24 horas.....	113
Figura 40: CXCL10 drenaje 6-24 horas.....	115
Figura 41: IL8 drenaje 6-24 horas.....	117
Figura 42: IL1 β drenaje 6-24 horas.	119
Figura 43: TNF- α drenaje 6-24 horas.	121

Figura 44: TGF- β drenaje 6-24 horas.....	122
Figura 45: TGF- β drenaje 6-24 horas boxplot.....	123
Figura 46: IL6 suero-drenaje 24 horas.....	125
Figura 47: CXCL10 suero-drenaje 24 horas.....	127
Figura 48: IL8 suero-drenaje 24 horas.....	129
Figura 49: IL1 β suero-drenaje 24 horas.....	131
Figura 50: TNF- α suero-drenaje 24 horas.....	133
Figura 51: TGF- β suero-drenaje 24 horas.....	134
Figura 52: TGF- β suero-drenaje 24 horas boxplot.....	135
Figura 53: Grado de fibrosis 0.....	137
Figura 54: Grado de fibrosis 1.....	138
Figura 55: Grado de fibrosis 2.....	139
Figura 56: Grado de fibrosis 3.....	140

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Factores de riesgo histológico.....	9
Tabla 2: Categorías de evaluación BIRADS®.....	16
Tabla 3: Grado histológico de Nottingham.....	19
Tabla 4: Clasificación TNM: T.....	24
Tabla 5: Clasificación TNM: cN.....	24
Tabla 6: Clasificación TNM: pN.....	25
Tabla 7: Clasificación TNM: M.....	26
Tabla 8: Clasificación TNM: Estadiaje.....	26
Tabla 9: Método OSNA.....	32
Tabla 10: Características TARGIT y ELIOT.....	40
Tabla 11: Criterios de selección RIO.....	74
Tabla 12: Criterios de exclusión RIO.....	75
Tabla 13: Escala SOMA/LENT.....	78
Tabla 14: Edad.....	83
Tabla 15: Motivo de consulta.....	84
Tabla 16: Tamaño tumoral.....	85
Tabla 17: Centricidad y focalidad.....	89
Tabla 18: Biopsia selectiva de ganglio centinela.....	91
Tabla 19: Clasificación TNM.....	92
Tabla 20: Invasión linfovascular.....	94
Tabla 21: HER2.....	95
Tabla 22: Muestra.....	96
Tabla 23: Análisis bivariante.....	98
Tabla 24: IL6 suero preoperatorio-24 horas.....	101
Tabla 25: CXCL10 suero preoperatorio-24 horas.....	103
Tabla 26: IL8 suero preoperatorio-24 horas.....	105
Tabla 27: IL1 β suero preoperatorio-24 horas.....	107
Tabla 28: TNF- α suero preoperatorio-24 horas.....	109
Tabla 29: TGF- β suero preoperatorio-24 horas.....	111
Tabla 30: IL6 drenaje 6-24 horas.....	113
Tabla 31: CXCL10 drenaje 6-24 horas.....	115
Tabla 32: IL8 drenaje 6-24 horas.....	117
Tabla 33: IL1 β drenaje 6-24 horas.....	119
Tabla 34: TNF- α drenaje 6-24 horas.....	121
Tabla 35: TGF- β drenaje 6-24 horas.....	123
Tabla 36: IL6 suero-drenaje 24 horas.....	125
Tabla 37: CXCL10 suero-drenaje 24 horas.....	127
Tabla 38: IL8 suero-drenaje 24 horas.....	129
Tabla 39: IL1 β suero-drenaje 24 horas.....	131
Tabla 40: TNF- α suero-drenaje 24 horas.....	133
Tabla 41: TGF- β suero-drenaje 24 horas.....	135
Tabla 42: Grado de fibrosis.....	136
Tabla 43: Estudios previos.....	145

LISTADO DE ABREVIATURAS

ACR: *American college of Radiology*

ACS: *American cancer society*

AgRP: proteína r-agouti

AJCC: *American joint committee on cancer*

ALDH: aldehído deshidrogenasa

APBI: irradiación parcial acelerada de la mama

ASTRO: *American society for radiation Oncology*

ASO: oligonucleótido antisentido

ATM: tipo de quinasa

ATP: trifosfato de adenosina

BAG: biopsia con aguja gruesa

BAV: biopsia asistida por vacío

BCR: receptores de los linfocitos B

BI-RADS®: *breast imaging report and database system*

BRCA 1: *gen breast cancer 1*

BRCA 2: *gen breast cancer 2*

BSGC: biopsia selectiva del ganglio centinela

CA 15.3: antígeno carbohidratado 15.3

CAF: fibroblastos asociados al cáncer

CEA: antígeno carcinoembrionario

CD: *cluster* de diferenciación

CDI: carcinoma ductal infiltrante

CDIS: carcinoma ductal *in situ*

CIS: carcinoma *in situ*

CK19: citoqueratina 19

CLI: carcinoma lobulillar infiltrante

CLIS: carcinoma lobulillar *in situ*

CPARP: familia de polimerasas escindidas por caspasas.

CTLA-4: Antígeno 4 del linfocito T citotóxico

cTNM: T-tumor, N-ganglionar, M-metástasis clínico

CXCL: quimiocinas

CXCR: receptores de quimiocinas

DAMPs: moléculas derivadas de células dañadas.

DNA: ácido desoxirribonucleico

DT: desviación típica

E-cadherina: cadherina de origen epitelial

EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico

ELIOT: *electron intraoperative radiotherapy*

EMT: transición epitelio-mesenquimal

ESTRO: *European society for Radiotherapy and Oncology*

FDA: *food and drug administration*

FGF: factor de crecimiento de fibroblasto

FISH: hibridación fluorescente *in situ*

GC: ganglio centinela

G-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos

GM-CSF: factor estimulante de colonias de macrófagos de granulocitos

GRO: oncogen regulador del crecimiento

H2AX: tipo de proteína histona.

HER2: factor 2 de crecimiento epidérmico humano

HLA: antígeno leucocitario humano

ICAM: moléculas de adhesión intracelular

IDO: indolamina 2,3-dioxigenasa

Ig: inmunoglobulina

IL: interleuquinas

IL1 β : interleuquina 1 beta

IFN- γ : interferón γ

LVI: invasión linfovascular

MCF-7: línea celular de cáncer de mama

MCP: proteína quimiotáctica de monocitos

MDA-MB-468: línea celular de cáncer de mama

MDSC: células mieloides supresoras

Mip: proteínas inflamatorias de macrófagos

miR: micro ácido ribonucleico

N-cadherina: cadherina de origen mesenquimal

NF κ B: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NK: *natural killer*

NO: óxido nítrico

nparLD: *An R Software Package for the Nonparametric Analysis of Longitudinal Data in Factorial Experiments*

OSNA: *one-step nucleic acid amplification system*®

PAAF: punción aspiración con aguja fina

PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos

PDGF-BB: factor de crecimiento derivado de plaquetas BB

PD-L1: ligando 1 de muerte programada

PRRs: receptores de reconocimiento de patógenos

p TNM: T-tumor, N-ganglionar, M-metástasis anatomopatológico

RIO: radioterapia intraoperatoria

RM: resonancia nuclear

RNA_m: ácido ribonucleico mensajero

ROLL: *radio occult lesion localization*

ROS: especies de oxígeno reactivo

RT: radioterapia

SESPM: sociedad española de patología mamaria y senología

SNOLL: *scentinel node occult lesion localization*

SOMA/LENT: *Subjective, Objective, Management, Analytic, Late Effect of Normal Tissue*

STAT3: factor de transcripción transductor de señales y activador de transcripción 3

sTNFR: receptor de factor de necrosis tumoral soluble

TAM: macrófagos asociados a tumores

TARGIT: *targeted intraoperative radiotherapy*

TCR: receptores de los linfocitos T

TGF- β : factor de crecimiento transformante beta.

Tie: tirosin quinasa con factor de crecimiento epidérmico e inmunoglobulina

TIL: linfocitos infiltrantes del tumor

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa

TNFRSF: receptor de la superfamilia del factor de necrosis tumoral

TNM: T-tumor, N-ganglionar, M-metástasis

T-reg: linfocitos T reguladores

VCAM: moléculas de adhesión vascular

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

WBRT: radioterapia completa de la mama

1. Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1 SITUACIÓN ACTUAL DEL CÁNCER DE MAMA

El cáncer se encuentra entre las primeras causas de muerte en los países industrializados, representando la segunda causa de mortalidad en España. En 2015, uno de cada cinco fallecimientos en mujeres en nuestro país fue por tumores malignos.

De todos los tipos de cáncer, el de mama es el más frecuente en la mujer, causando 6213 muertes en el año 2014 en nuestro país.



Figura 1: Mortalidad por cáncer en España en 2014. Imagen adaptada de *Sociedad Española de Oncología Médica. Las cifras del cáncer en España [Internet]. 2017. Disponible en: <http://www.seom.org>*

Sin embargo, las últimas estadísticas muestran una discreta tendencia a la disminución en la mortalidad probablemente debido a las actividades preventivas, un diagnóstico precoz por los métodos de cribado y a un mejor manejo terapéutico de las pacientes. Cabe resaltar que actualmente en España los programas de cribado cubren un 90% de la población diana con una importante participación en los mismos, que en 2011 llegó al 73%.

En España se diagnostican 27.000 nuevos casos/año de cáncer de mama y la incidencia sigue incrementándose a razón de un 1-2% anual debido principalmente a la detección precoz y al aumento de la esperanza de vida en la población general. Sin embargo, su prevalencia a los 5 años, es la segunda más alta en España, de 104.210 casos en 2012, determinada por su baja mortalidad.



Figura 2: Incidencia por cáncer en la mujer en España en 2015. Imagen adaptada de Galceran J, Ameijide A, Carulla M, Mateos A, Quirós JR, Rojas D et al. *Cancer incidence in Spain, 2015. Clin Transl Oncol. 2017; 19(7): 799-825*

El impacto económico del cáncer es significativo y sigue creciendo. Se ha calculado que el coste total del cáncer en 2010 fue, aproximadamente, de 1,16 billones de dólares. En España es la segunda causa de estancia hospitalaria según la encuesta de morbilidad hospitalaria en 2014, representando el 11.6% del total de causas de ingreso.¹⁻⁶

La estrategia de actuación contra el cáncer se ha ido modificando en las últimas décadas. Los métodos de detección precoz ya comentados, el uso de terapias neoadyuvantes cada vez más efectivas y dirigidas según los subtipos moleculares de cáncer de mama junto con la modificación de las técnicas quirúrgicas ha permitido evolucionar hacia modelos terapéuticos menos agresivos y más conservadores en mama y axila bajo el axioma “ *Menos es más*” demandado por nuestras pacientes. La aplicación de estos modelos se ha visto favorecida por la implantación de los programas de screening en cáncer de mama que, a su vez, conllevan un mayor volumen de casos detectados de forma temprana que obligan a ofrecer de forma equitativa un rápido acceso a diagnóstico y tratamientos definitivos dentro del marco de un equipo multidisciplinar.^{7,8}

1.2 ANATOMÍA QUIRÚRGICA DE LA MAMA

La mama se sitúa en la pared anterior del tórax desde la segunda a la sexta costilla y desde el esternón a la línea axilar media. A nivel práctico podemos considerar la existencia de cuatro cuadrantes, siendo el cuadrante supero-externo el que contiene mayor cantidad de tejido de la glándula por presentar una prolongación hacia la axila denominada cola de Spence.⁹

La glándula mamaria está cubierta por una lámina de tejido fibroso llamada cápsula fibrosa y se sitúa entre la fascia pectoral superficial y el panículo adiposo donde se aloja un plexo arterial formado por las ramificaciones tegumentarias superficiales de las arterias de la mama, así como una red venosa superficial. Entre la glándula mamaria y el músculo pectoral mayor encontramos el espacio retromamario, una capa de tejido areolar laxo que contiene vasos linfáticos.^{10, 11}

En la mama existe epitelio glandular, tejido adiposo, estroma fibroso y estructuras de soporte. En mujeres postmenopáusicas, las estructuras glandulares involucionan y se reemplazan por tejido adiposo.¹⁰

La mama está formada por varias glándulas independientes llamadas lóbulos que se dividen, a su vez, en lobulillos y ácinos. Cada lóbulo contiene un conducto excretor denominado conducto galactóforo que se dirige de forma sinuosa hacia el pezón. Estos conductos, antes de entrar en el pezón, presentan una dilatación llamada seno galactóforo y terminan en línea recta hacia el vértice del pezón en el poro galactóforo. Cada conducto principal se ramifica progresivamente y acaba en los ácinos, que son las glándulas productoras de leche de la mama lactante y junto con los pequeños conductos eferentes forman los lobulillos. Los conductos eferentes terminales están inmersos en un tejido conjuntivo laxo especializado con capilares, linfocitos, células plasmáticas y macrófagos. Este estroma intralobulillar se diferencia del interlobulillar, más denso y menos celular.^{10, 11}

Los ligamentos suspensorios de Cooper son unas bandas fibrosas que aportan soporte estructural a la glándula mamaria, constituyendo la fascia interlobulillar del parénquima mamario desde la fascia superficial por debajo de la dermis hasta la fascia profunda de la mama por encima del músculo pectoral. Cuando el cáncer

Introducción

de mama produce acortamiento de estos ligamentos, producirá retracción en la piel.⁹⁻¹¹

La zona central anterior de la mama corresponde al complejo areola-pezón, una zona de piel altamente pigmentada e inervada.⁹

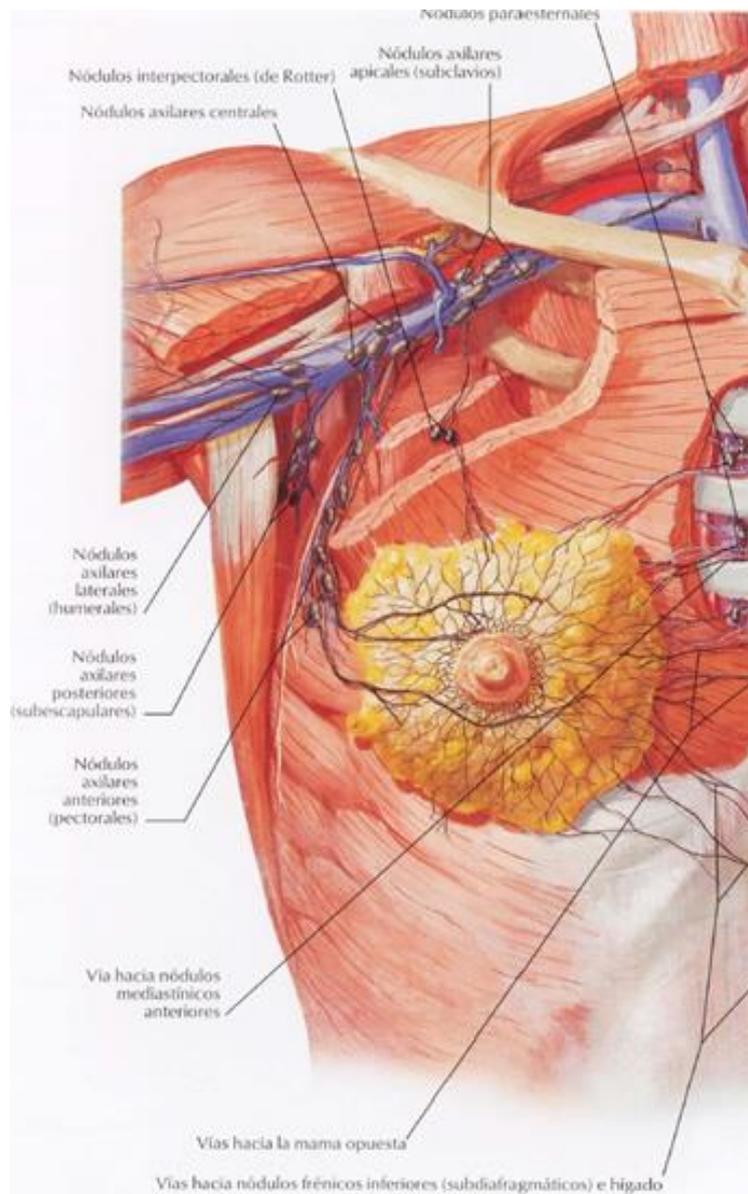


Figura 3: Ganglios linfáticos. Imagen adaptada de *Netter FH. Atlas de anatomía humana. 3ª edición. Barcelona: Masson S.A.; 2003*

Los vasos linfáticos son abundantes en el parénquima y dermis mamarios. Se distinguen diferentes agrupaciones de ganglios de drenaje: ^{10,11}

1. *Ganglios linfáticos axilares*: los vasos linfáticos de la mama drenan en una red subareolar de la cual parten dos troncos linfáticos principales, constituyendo el 75% del flujo linfático de la mama, que se dirigen hacia la axila donde los ganglios linfáticos se encuentran en el interior del tejido graso areolar laxo.

Los ganglios axilares se describen según su relación con el músculo pectoral menor en tres niveles anatómicos. Los ganglios del nivel I se sitúan lateralmente al borde lateral del músculo pectoral menor, los ganglios del nivel II posteriormente al mismo y los ganglios de nivel III comprenden los ganglios subclaviculares situados medialmente al músculo pectoral menor.

Sin embargo, los vasos linfáticos procedentes de la cara profunda de la mama drenan a los nodulos linfáticos apicales a través del músculo pectoral mayor o rodeando su borde inferior.

2. *Ganglios linfáticos paraesternales o mamarios internos*: los vasos linfáticos de la zona medial de la glándula mamaria atraviesan el músculo pectoral mayor y los espacios intercostales hacia los ganglios mamarios internos. Ésta es la vía predominante hasta en el 5% de los casos y aparece como vía secundaria junto al drenaje axilar en aproximadamente el 20% de las pacientes.

3. *Ganglios linfáticos interpectorales o de Rotter*: Grossman y Rotter describieron este grupo de ganglios que se encuentran entre el músculo pectoral mayor y menor.

4. *Ganglios linfáticos supraclaviculares*: Monard y Guénin identificaron un tronco linfático poco frecuente que se dirige directamente desde la zona superior de la mama hacia los nodulos linfáticos supraclaviculares, contiguos a los ganglios subclaviculares de la axila.

Introducción

La glándula mamaria está vascularizada en su parte medial por ramas perforantes de la arteria torácica interna. La parte lateral e inferior de la mama recibe su vascularización de ramas de la arteria axilar, concretamente de la arteria torácica lateral, subescapular, toracoacromial y torácica superior. Así mismo, la glándula mamaria va a recibir aporte sanguíneo de ramas de las arterias intercostales.⁹⁻¹¹

La red venosa de la mama drena en las venas torácicas laterales en su parte lateral, en la vena torácica interna medialmente y en las venas intercostales posteriormente.⁹⁻¹¹

En la cara medial de la axila, está el nervio torácico largo o de Bell que inerva el músculo serrato anterior. Además, en el vaciamiento axilar vamos a encontrar el nervio toracodorsal que nace en el plexo braquial, entra en la axila por debajo de la vena axilar, cerca de la entrada del nervio torácico largo, e inerva el músculo dorsal ancho.^{10, 11}

1.3 MANEJO DEL CÁNCER DE MAMA

1.3.1 Generalidades

El manejo del paciente con cáncer ha cambiado en los últimos años. Actualmente, se recomienda que, una vez diagnosticado, la paciente sea derivada a una unidad de mama que proporcione atención multidisciplinar en la que participen los profesionales de las distintas especialidades diagnósticas y terapéuticas implicadas, que disponga de todos los tratamientos que pueda requerir y en la que las decisiones terapéuticas sean tomadas mediante un comité de tumores.

Estas unidades deben cumplir los criterios de calidad recomendados en la bibliografía en cuanto a la normalización del proceso de decisión de los procedimientos, la garantía de calidad de los tratamientos o el cumplimiento de los estándares de tiempo de demora. Estos tiempos se han fijado en inferior a 7 días desde la confirmación anatomopatológica del diagnóstico de cáncer hasta la evaluación por el comité de tumores y en 21 días hasta el inicio del tratamiento quirúrgico.

El comité de mama compuesto por un extenso equipo multidisciplinar, individualiza cada una de las decisiones de acuerdo a protocolos de actuación de diagnóstico y tratamiento consensuados.^{1, 7, 8}

1.3.2 Factores de riesgo

La identificación de los factores de riesgo del cáncer de mama es importante para la planificación de estrategias de cribado poblacional y en el manejo terapéutico de las pacientes.

Podemos diferenciar los siguientes factores de riesgo:

1. Edad y sexo: la incidencia de cáncer de mama aumenta con la edad hasta la década de los 70 años, siendo más frecuente entre las mujeres.¹²
2. Antecedentes personales de cáncer de mama: condicionan mayor riesgo de cáncer de mama contralateral. El riesgo real es de 0.5-1%/año en pacientes jóvenes y de 0.2%/año en pacientes de mayor edad.¹³⁻¹⁷
3. Factores de riesgo histológicos: el riesgo según el tipo de diagnóstico histológico varía según la edad, el estado respecto a la menopausia y los antecedentes familiares, que pueden incluso duplicar el riesgo si se asocian a enfermedad proliferativa con atipia. Los diferentes factores de riesgo histológico se muestran en la tabla a continuación:^{11, 18-20}

DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO	RIESGO RELATIVO
Enfermedad no proliferativa	1
Enfermedad proliferativa sin atipia	1.3-1.9
Enfermedad proliferativa con atipia	3.7-4.2
y antecedentes familiares	4-9
Carcinoma lobulillar in situ (CLIS)	>7

Tabla 1: Factores de riesgo histológico. Tabla adaptada de Hunt KK, Green MC, Buchholz TA. *Enfermedades de la mama*. En: Townsend CM. *Sabiston Tratado de Cirugía. Fundamentos biológicos de la práctica quirúrgica moderna*. 19ª ed. Barcelona: Elsevier; 2013. p.824-69.

4. Factores genéticos: son los responsables del 5-10% de todos los cánceres de mama. Las mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 se relacionan con cáncer de mama con una penetrancia en torno al 56%.
5. Factores de riesgo reproductores: la exposición a estrógenos como menarquia precoz, menopausia tardía, nuliparidad o edad tardía del primer parto, aumentan el riesgo de cáncer de mama.
6. Uso de hormonas exógenas: el uso de anticonceptivos orales y de la terapia hormonal sustitutiva en mujeres postmenopáusicas aumentan, de la misma forma, el riesgo de cáncer de mama.
7. Patrón mamográfico: el patrón mamográfico denso presenta un riesgo 5 veces superior al patrón graso.
8. Factores de estilo de vida: obesidad, alto consumo de grasa, sedentarismo, alcohol, tabaco y exposición a altas dosis de radiaciones ionizantes o plaguicidas.²¹⁻³⁰

1.3.3 Diagnóstico

El diagnóstico de cáncer de mama se basa en una correcta anamnesis, una exploración física minuciosa que examine mama y axila, la realización de pruebas de imagen y finalmente, en una confirmación anatomopatológica.

1.3.3.1 Anamnesis

La anamnesis del cáncer de mama debe recabar datos sobre la edad de la paciente, antecedentes familiares, antecedentes patológicos, tratamiento habitual, antecedentes específicos de aspectos ginecológicos como edad de menarquia y menopausia, aspectos obstétricos y mamarios como exéresis previa de tumor benigno o maligno.

La sospecha clínica de cáncer de mama actualmente, se establece principalmente por un hallazgo patológico en la mamografía, debido a la instauración generalizada de programas de cribado.

Sin embargo, todavía existen casos en los que la enfermedad se presenta como la clásica masa mamaria palpable caracterizada por ser una lesión dura, fija y con

bordes irregulares. Esta presentación se da principalmente en pacientes de lugares donde no están instaurados los programas de cribado del cáncer de mama, en pacientes jóvenes no subsidiarias de cribado, así como en los tiempos de intervalo entre las mamografías o por lesiones que aparecen ocultas en las mismas, que pueden llegar a representar hasta el 15%.^{31, 32}

1.3.3.2 Exploración física

La exploración física debe ser minuciosa y realizarse tanto en la mama como en la axila de forma bilateral.

En el caso de la mama detallaremos la naturaleza de la lesión y sus características (retracción, ulceración, inflamación), su localización, si se asocia a secreción por el pezón, así como las características de la mama (tamaño, ptosis).

La exploración de la axila, por su parte, deberá ser igualmente exhaustiva, identificando si los hubiera ganglios clínicamente invadidos o fijos.^{31, 32}

1.3.3.3 Pruebas de imagen diagnósticas:

Se utilizan las siguientes pruebas complementarias en el diagnóstico radiológico para estadificación loco-regional y estudio de extensión:

1. Mamografía:

La mamografía es la técnica más utilizada en el estudio de la patología de la mama, de elección en los programas de cribado y en cualquier paciente sintomática o con antecedentes demostrados de riesgo familiar mayor de 35 años.^{33,34}

Actualmente, se recomienda realizar cribado poblacional de forma bienal en mujeres desde los 50 hasta los 75 años.

Existe controversia en cuanto a la realización de la prueba en mujeres con edades comprendidas entre los 40 y 49 años debido a sus modestos beneficios. La *United States Preventive Services Task Force* se pronunció en contra de la realización de la mamografía de cribado en este grupo de edad¹³, sin embargo, la *American Cancer Society* (ACS) recomienda comenzar a la edad de 45 años debido a que el riesgo absoluto de cáncer de

mama, así como de mortalidad en el grupo de edad de 45 a 49 años se parece más al del grupo de edad de 50 a 54 años que al de 40 a 44 años.

La ACS, además, recomienda realizar el cribado de forma anual hasta los 55 años y, posteriormente, de forma bienal.³¹

La sensibilidad de la prueba es aproximadamente del 75-95% y la especificidad del 80-90%. Su mayor limitación viene determinada por la densidad mamaria.^{32, 35}

Los hallazgos de la mamografía se describen mediante el sistema BI-RADS® (*Breast Imaging Report and Database System*) que se desarrolló en 1993 por el *American College of Radiology* (ACR) para unificar el léxico utilizado en los informes radiológicos, así como para establecer un grado de sospecha y recomendación. Este sistema se utiliza así mismo en la descripción de los hallazgos en ecografía y resonancia mamaria. La última edición del BIRADS® es la quinta y fue publicada en febrero de 2014.

Una masa de alta densidad espiculada representa el hallazgo más característico de cáncer de mama en la mamografía.^{36, 37}

Composición de la mama	a. Las mamas son casi completamente grasa b. Áreas dispersas de tejido fibroglandular c. Heterogéneamente densas (lo cual puede ocultar nódulos pequeños) d. Extremadamente densas (lo cual disminuye la sensibilidad de la mamografía)		
Masa	Forma	Oval, redonda, irregular	
	Margen	Circunscrito, microlobulado, indistinto, espiculado	
	Densidad	Alta, baja, igual, grasa	
Asimetría	Asimetría, global, focal, en desarrollo		
Calcificaciones	Morfología	Distribución	
	Típicamente benignas	Alta sospecha	a. Difusa b. Regional c. Agrupada d. Lineal e. Segmentada
	f. Cutáneas g. Vasculares h. Groseras «palomita de maíz» i. Barra j. Redondas k. En anillo l. Distróficas m. Leche de calcio n. Suturas	o. Amorfas p. Heterogéneas groseras q. Finas pleomórficas r. Finas lineales o finas lineales ramificadas	
Características asociadas	Retracción de la piel, retracción del pezón, engrosamiento cutáneo, engrosamiento trabecular, adenopatía axilar, distorsión de la arquitectura y calcificaciones		
Ubicación de la lesión	Lateralidad, cuadrante y posición horaria, profundidad y distancia desde el pezón		

Figura 4: BIRADS® léxico mamográfico. Imagen adaptada de Camacho-Piedra C., Espíndola-Zarazúa V. *Actualización de la nomenclatura BI-RADS®. Anales de Radiología México. 2018; 17:100-8*

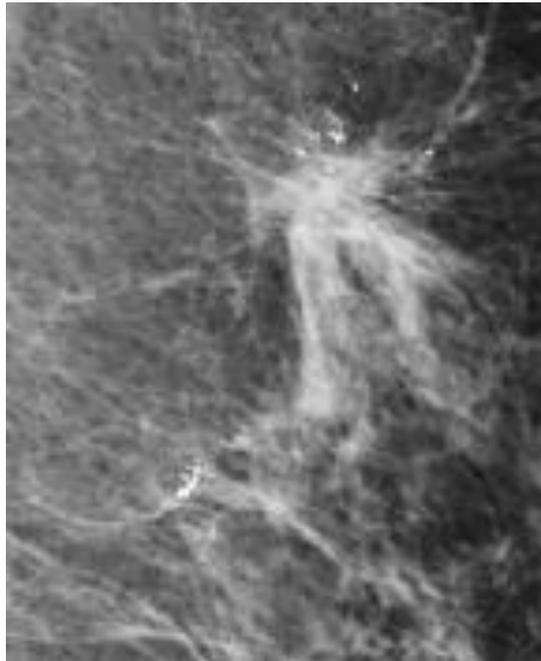


Figura 5: Masa irregular en mamografía. Imagen adaptada de *Camacho-Piedra C., Espíndola-Zarazúa V. Actualización de la nomenclatura BI-RADS®. Anales de Radiología México. 2018; 17:100-8*

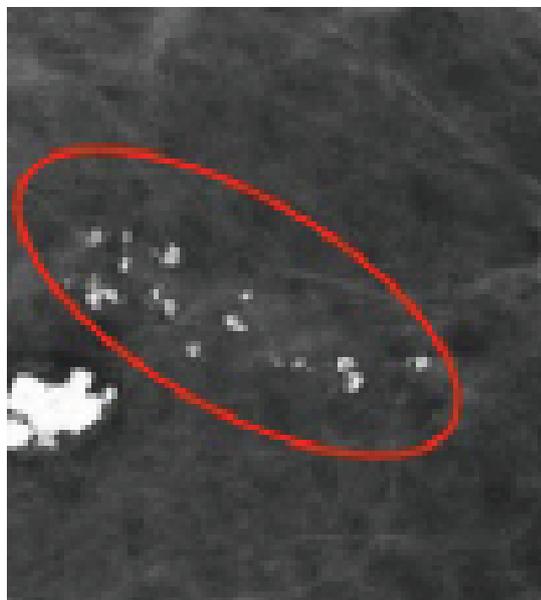


Figura 6: Calcificaciones sospechosas de malignidad en mamografía. Imagen adaptada de *Camacho-Piedra C., Espíndola-Zarazúa V. Actualización de la nomenclatura BI-RADS®. Anales de Radiología México. 2018; 17:100-8*

2. Ecografía mamaria:

La ecografía es la segunda técnica más utilizada en el diagnóstico de la patología mamaria. Entre sus ventajas destaca que no emplea radiaciones ionizantes y su alta disponibilidad, sin embargo, sus resultados son muy dependientes de la persona que los realiza, por lo que no se recomienda como herramienta de cribado.^{32, 38, 39}

Es útil para caracterizar más detalladamente una lesión benigna de una maligna, distinguir si una lesión es sólida o quística, y en el diagnóstico de lesiones en mamas densas.^{32, 39}

La ecografía se utiliza habitualmente como guía para la toma de biopsias.

Los hallazgos en la ecografía se describen, al igual que en el caso de la mamografía, mediante el sistema BI-RADS®.

Composición del tejido	a. Ecotextura de fondo homogénea grasa b. Ecotextura de fondo fibroglandular c. Ecotextura de fondo heterogénea	
Masa	Forma	Oval, redonda e irregular
	Margen	Circunscrito o no circunscrito: indistinto, angular, microlobulado o espiculado
	Orientación	Paralela y no paralela
	Patrón de eco	Anecoico, hiperecoico, complejo quístico y sólido, hipoeicoico, isoecoico y heterogéneo
	Características posteriores	Ausente, realce, sombreado, patrón combinado
Calcificaciones	a. Dentro de una masa b. Fuera de una masa c. Intraductales	
Características asociadas	Distorsión de la arquitectura, cambios ductales, cambios cutáneos, edema, vascularidad (ausente, interna, vasos al borde) y elasticidad	
Casos especiales	Quiste simple, microquistes, quiste complicado, lesiones sobre el espesor cutáneo, cuerpo extraño (incluyendo implantes), nódulo linfático intramamario, nódulo linfático axilar, anomalías vasculares, malformaciones arteriovenosas, enfermedad de Mondor, colecciones posquirúrgicas y necrosis grasa	

Figura 7: BIRADS® léxico ecográfico. Imagen adaptada de *Camacho-Piedra C., Espíndola-Zarazúa V. Actualización de la nomenclatura BI-RADS®. Anales de Radiología México. 2018; 17:100-8*

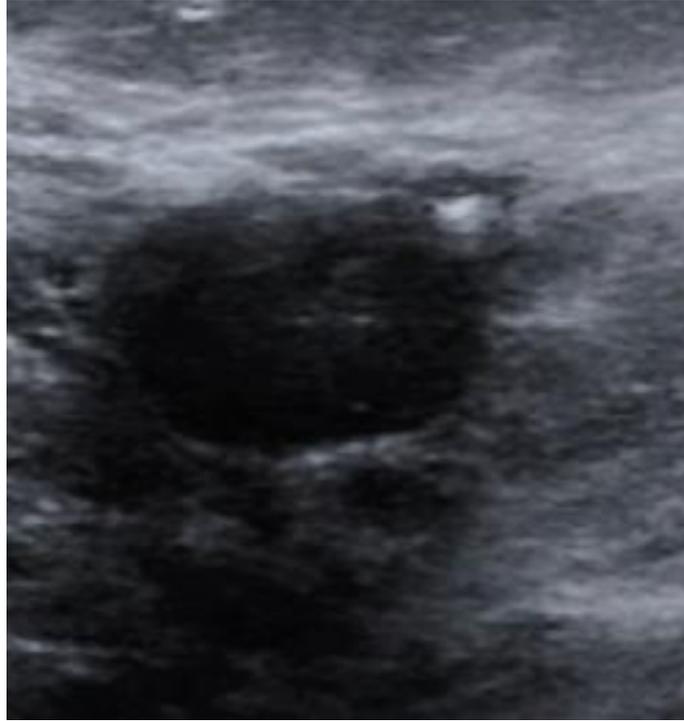


Figura 8: Masa en ecografía. Imagen adaptada de *Camacho-Piedra C., Espíndola-Zarazúa V. Actualización de la nomenclatura BI-RADS®. Anales de Radiología México. 2018; 17:100-8*

El sistema BI-RADS® de descripción establece posteriormente, como hemos comentado, un grado de sospecha y recomendación que coincide en el caso de los hallazgos objetivados tanto en la mamografía como en la ecografía, siendo aconsejable valorarlos de forma conjunta.³⁷

Categoría BI-RADS	Grado de sospecha	Recomendación
Categoría 0	Estudio incompleto	Evaluación adicional de imagen
Categoría 1	Estudio normal	Evaluación a intervalo normal
Categoría 2	Benigno	Evaluación a intervalo normal
Categoría 3	Probablemente benigno	Control en 6 meses
Categoría 4	4A: Baja sospecha de malignidad 4B: Moderada sospecha de malignidad 4C: Alta sospecha de malignidad	Estudio histológico
Categoría 5	Altamente sugestivo de malignidad	Estudio histológico
Categoría 6	Diagnóstico maligno comprobado por biopsia	Estadificación y planificación terapéutica

Tabla 2: Categorías de evaluación BIRADS®. *Elaboración propia*

3. Ecografía axilar:

La ecografía se considera la técnica de elección para el estudio de la afectación ganglionar tanto a nivel de las cadenas axilares como de la mamaria interna o de los ganglios supraclaviculares.

La ecografía axilar se solicitará sólo si existen dudas de afectación clínica axilar y ésta no ha sido realizada previamente. Si se aprecia ganglio de aspecto patológico, se completará el estudio histológico de la lesión mediante punción aspiración con aguja fina (PAAF).⁴⁰

4. Resonancia nuclear (RM):

La RM presenta una sensibilidad para el cáncer invasivo cercana al 100%, sin embargo, en el caso del carcinoma ductal in situ, la sensibilidad no llega al 60%. Por su parte, posee una especificidad moderada.^{32, 41}

Se utiliza para el screening en mujeres con alto riesgo de cáncer de mama, para identificar tumores primarios desconocidos en mujeres con metástasis

en ganglios linfáticos axilares, para el estudio de extensión locoregional, categorizar el tumor multifocal, multicéntrico o bilateral y en el estudio de aquellas mujeres con prótesis mamarias o mamas densas. Además, puede servir de guía para la toma de biopsias cuando tenemos lesiones que únicamente se detectan por este método de imagen.^{32, 42, 43}

Para la descripción de los hallazgos mediante esta técnica de imagen se utiliza igualmente el sistema BI-RADS®, que es similar al mostrado previamente en el caso de los hallazgos por mamografía y ecografía.

La RM posee un protocolo de estudio específico que incluye secuencias morfológicas, funcionales con administración endovenosa de un compuesto de gadolinio y un procesamiento posterior de las imágenes.

En el procesamiento de las imágenes se utilizan los datos obtenidos en las secuencias funcionales tras la administración de contraste y se analizan curvas de intensidad/tiempo. Según la morfología de la curva, se distinguen los siguientes tipos:

- Tipo I o progresivo: patrón de lesiones benignas.
- Tipo II o meseta: puede darse tanto en lesiones benignas como malignas.
- Tipo III o lavado: patrón de malignidad.^{41,44,45}

5. Otras pruebas de imagen diagnósticas:

Para el estudio de extensión del cáncer de mama se utilizan habitualmente las siguientes pruebas complementarias:

- Radiografía de tórax.
- Ecografía abdomino-pélvica.
- Rastreo óseo: en nuestro protocolo sólo se solicitará en tumores T2 en adelante o en aquellos con afectación axilar confirmada.

En el estudio de extensión se asocia además analítica sanguínea con especial interés en la función hepática con fosfatasa alcalina como indicador de posible afectación metastásica ósea y marcadores tumorales (CEA y CA 15.3).¹

1.3.3.4. Técnicas histopatológicas diagnósticas

Para la confirmación anatomopatológica del cáncer de mama disponemos de las siguientes técnicas: ⁴⁶

1. Punción aspiración con aguja fina (PAAF):

Es una técnica relativamente sencilla de ejecutar mediante la cual se realiza un análisis citológico de células. Suele llevarse a cabo bajo control ecográfico. Su principal indicación es el análisis de ganglios linfáticos sospechosos o como alternativa a la biopsia. Permite la obtención de material para la elaboración del patrón inmunohistoquímico del tumor.

2. Biopsia con aguja gruesa (BAG):

Es la técnica de elección para la toma de muestras de lesiones mamarias. Así mismo, suele realizarse bajo control ecográfico, aunque una alternativa es la utilización de la RM. Está indicada su realización principalmente en las lesiones categoría 4 y 5 de BI-RADS® y en las de categoría 3 con factores asociados de riesgo.

3. Biopsia asistida por vacío (BAV):

Es una técnica que obtiene muestras mayores que la BAG. Su indicación principal es la toma de muestras de microcalcificaciones sospechosas.

En caso de confirmación de neoplasia maligna, se deberá determinar en el informe anatomopatológico: ⁴⁷

- Tipo histológico.
- Grado histológico de Nottingham: valora diferenciación glandular (acinar/tubular), pleomorfismo nuclear e índice mitótico. Cada variable le da un valor de 1,2 o 3 y con la suma se obtiene el grado como se muestra a continuación:

Grado	Puntuación
1 (bien diferenciado)	3-5
2 (moderadamente diferenciado)	6,7
3 (mal diferenciado)	8,9

Tabla 3: Grado histológico de Nottingham. *Elaboración propia*

- Presencia de carcinoma in situ (CIS)
- Invasión linfovascular
- Presencia de microcalcificaciones
- Receptores hormonales: estrógenos y progesterona
- Índice de proliferación celular Ki67
- Factor 2 de crecimiento epidérmico humano (HER2)

1.3.4 **Clasificación**

1.3.4.1 Clasificación histológica

El cáncer de mama incluye un grupo de lesiones con una apariencia microscópica y un comportamiento biológico diferente.

En primer lugar, podemos diferenciar dos grandes grupos, el cáncer de mama no invasivo y el cáncer de mama invasivo.

El cáncer de mama no invasivo se divide a su vez en CLIS y carcinoma ductal *in situ* o carcinoma intraductal (CDIS). A su vez, se distinguen 4 tipos de CDIS: papilar, cribiforme, sólido y comedo. Dentro de estos tipos, el papilar y el cribiforme son los de menor malignidad en su transformación en cánceres invasivos.⁴⁸⁻⁵⁰

El cáncer de mama invasivo se diferencia del grupo anterior por su ausencia de arquitectura global, infiltración del estroma y pérdida de función o forma del órgano glandular. Se divide en los siguientes subtipos principales: ⁵¹

- Carcinoma ductal infiltrante (CDI) (50-70%): son principalmente adenocarcinomas, suelen reflejarse como anomalías definidas en la mamografía y a menudo se palpan como un tumor delimitado. En la mayoría de los casos, asocia focos de CDIS en grado variable.

Introducción

- Carcinoma lobulillar infiltrante (CLI) (10%): son tumores que suelen invadir la mama en filas únicas, lo que los oculta en la mamografía y en la exploración clínica, por lo que suelen detectarse más tardíamente. Son más frecuentemente bilaterales y multicéntricos.
- Otros subtipos: existe una amplia variedad de subtipos histológicos menos frecuentes. Los más representativos se enumeran a continuación:
 - Tumores epiteliales:
 - Carcinoma mixto: ductal/lobulillar (7%)
 - Carcinoma tubular (2-3%)
 - Carcinoma mucinoso o coloide (2-3%)
 - Carcinoma medular (5%)
 - Carcinoma cribiforme (1-3%)
 - Carcinoma papilar (1-2%)
 - Carcinoma quístico adenoideo (1%)
 - Carcinoma metaplásico (1%)
 - Tumores mioepiteliales
 - Tumores fibroepiteliales: Phyllodes
 - Tumores mesenquimales: angiosarcoma
 - Tumores del pezón: enfermedad de Paget
 - Linfoma maligno
 - Tumores metastásicos

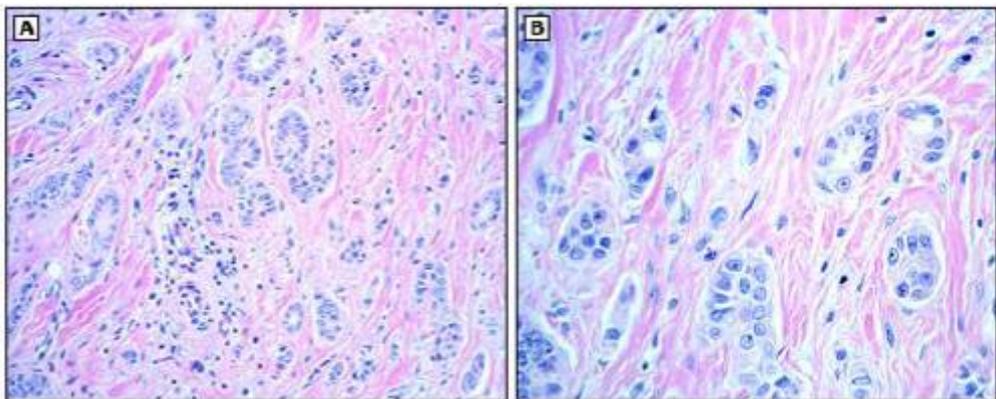


Figura 9: CDI. Imagen adaptada de *Bleiweiss IJ. Pathology of breast cancer. Post TW, ed. UpToDate. Waltham, MA: UpToDate Inc. [actualizado Dic 2019]. Disponible en: <https://www.uptodate.com>*

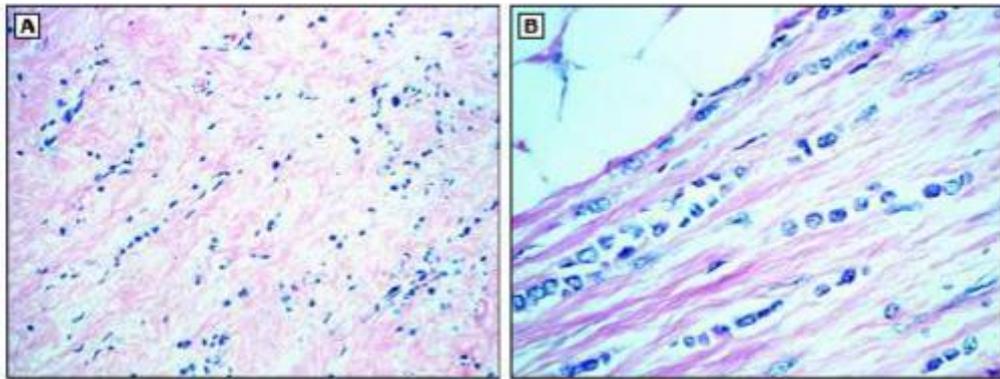


Figura 10: CLI. Imagen adaptada de *Bleiweiss IJ. Pathology of breast cancer. Post TW, ed. UpToDate. Waltham, MA: UpToDate Inc. [actualizado Dic 2019]. Disponible en: <https://www.uptodate.com>*

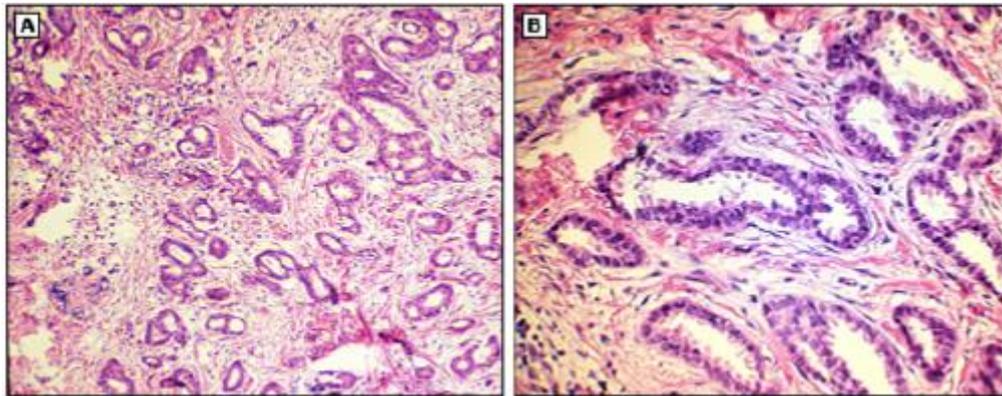


Figura 11: Carcinoma tubular. Imagen adaptada de *Bleiweiss IJ. Pathology of breast cancer. Post TW, ed. UpToDate. Waltham, MA: UpToDate Inc. [actualizado Dic 2019]. Disponible en: <https://www.uptodate.com>*

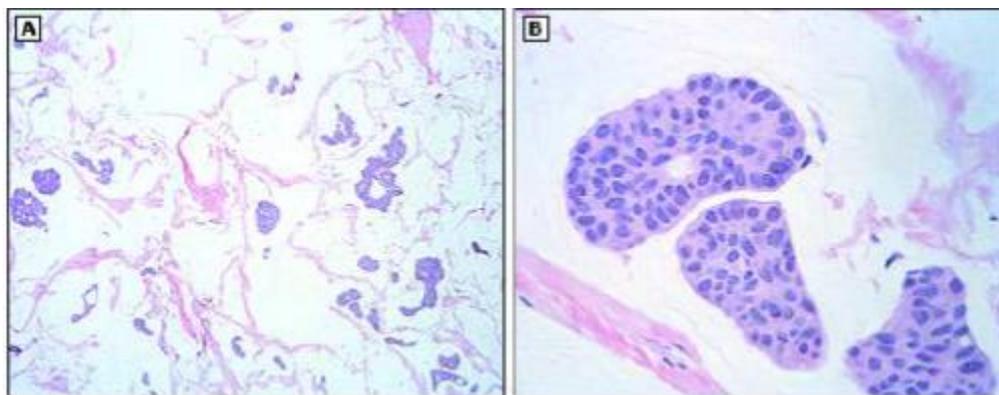


Figura 12: Carcinoma mucinoso. Imagen adaptada de *Bleiweiss IJ. Pathology of breast cancer. Post TW, ed. UpToDate. Waltham, MA: UpToDate Inc. [actualizado Dic 2019]. Disponible en: <https://www.uptodate.com>*

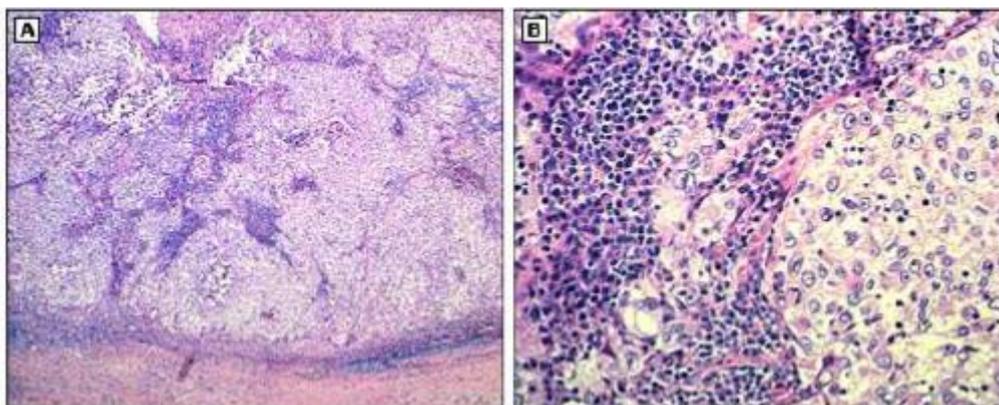


Figura 13: Carcinoma medular. Imagen adaptada de *Bleiweiss IJ. Pathology of breast cancer. Post TW, ed. UpToDate. Waltham, MA: UpToDate Inc. [actualizado Dic 2019]. Disponible en: <https://www.uptodate.com>*

Sin embargo, la clasificación histológica basada únicamente en las características microscópicas del cáncer de mama no refleja fielmente el pronóstico y la respuesta terapéutica de estos tumores. Actualmente, debido al desarrollo de las técnicas moleculares e inmunohistoquímicas, se identifican diferentes subtipos de cáncer de mama atendiendo a estas características: ⁵¹

- Cáncer de mama luminal: su denominación proviene de su similitud con la expresión génica del epitelio normal de la mama. Se caracterizan por presentar receptores hormonales de estrógeno y de progesterona positivos. Son los más frecuentes, en torno al 75-80%, y se diferencian en tipo A y B. Los de tipo A presentan un índice de Ki67 inferior al 14%, lo que se relaciona con su mejor pronóstico. Los de tipo B, por su parte, son más agresivos, y pueden presentar un índice de Ki67 superior al 14%, así como expresar HER2.
- Cáncer de mama HER2: estos tumores representan aproximadamente el 10-15% de los cánceres de mama y se caracterizan por la expresión de HER2, que se relaciona con mayor agresividad del tumor y tendencia a producir metástasis. Además, son negativos o poseen niveles bajos para los receptores hormonales de estrógeno y progesterona. Todo ello hace que su pronóstico sea peor.

- Cáncer de mama triple negativo o basal: estos tumores representan aproximadamente el 11-20% de los cánceres de mama y se caracterizan por no expresar los receptores hormonales de estrógeno y progesterona, así como HER2. Poseen el peor pronóstico de todos los subtipos previamente mencionados, con mayor mortalidad y riesgo de recidiva.

1.3.4.2 Clasificación TNM:

La estadificación del cáncer de mama se realiza con el sistema de clasificación TNM del *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) cuyo objetivo es agrupar pacientes en categorías de riesgo que puedan guiar las recomendaciones terapéuticas.

Se basa en el tamaño del tumor primario (T), el estado de los ganglios linfáticos regionales (N) y la presencia o ausencia de metástasis a distancia (M).

Los pacientes son preasignados a un grupo de riesgo clínico antes del tratamiento (c TNM), y aun estadio anatomopatológico definitivo después del tratamiento quirúrgico (p TNM).

La última edición de esta clasificación, la octava, es efectiva desde Enero del año 2018 e incluye, además del grupo de estadio anatómico, un grupo de estadio pronóstico incluyendo las variables de grado tumoral, expresión de receptores de estrógeno y progesterona y de HER2 (Anexo I).⁴⁶

Tumor Primario (T)	Tx	El tumor primario no puede ser evaluado	
	T0	No hay evidencia de tumor primario	
	Tis	Carcinoma in situ , CDIS o Enfermedad de Paget (no diseminación a tejidos colindantes)	
	T1-4	Tumor invasivo, tamaño y/o alcance del tumor primario	
		T1: tumor ≤ 20mm - T1mi: tumor ≤ 1mm - T1a: tumor >1mm y ≤ 5mm - T1b: tumor >5mm y ≤ 10mm - T1c: tumor >10mm y ≤ 20mm	
		T2: tumor >20mm y ≤ 50mm	
		T3: tumor > 50mm	
T4: tumor de cualquier dimensión que se extiende a pared costal o piel (nódulos o ulceraciones dérmicas)			

Tabla 4: Clasificación TNM: T. Tabla adaptada de *Hortobagyi GN, Connolly JL, D’Orsi CJ, Edge SB, Mittendorf EA, Rugo HS, et al. Breast. In: AJCC Cancer Staging Manual [Internet]. 8th ed. Chicago: Springer International Publishing; 2017 [cited 2020 Jan 3]. p. 58*

Ganglios linfáticos regionales (N)	Nx	Ganglios linfáticos regionales no pueden ser evaluados
	N0	No hay afectación ganglionar linfática regional
	N1-3	Invasión de los ganglios linfáticos regionales (número y/o extensión)
	Estadaje clínico de la afectación ganglionar (cN)	
	N1	Metástasis ganglionar(es) ipsilateral(es) niveles I y II axilar(es)
	N2	Metástasis ganglionares ipsilaterales niveles I y II axilares formando conglomerados o ganglios afectados de la cadena mamaria interna ipsilateral en ausencia de afectación axilar
	N3	Metástasis ganglionar ipsilateral infraclavicular (nivel III axilar) con o sin afectación de niveles I y II; o afectación de cadena mamaria interna ipsilateral y axilar; o afectación ganglionar supraclavicular con o sin afectación axilar

Tabla 5: Clasificación TNM: cN. Tabla adaptada de *Hortobagyi GN, Connolly JL, D’Orsi CJ, Edge SB, Mittendorf EA, Rugo HS, et al. Breast. In: AJCC Cancer Staging Manual [Internet]. 8th ed. Chicago: Springer International Publishing; 2017 [cited 2020 Jan 3]. p. 5*

Estadíaaje anatomopatológico ganglionar (pN)		
Ganglios linfáticos regionales (N)	pN0	No hay afectación metastásica ganglionar o Células tumorales aisladas <ul style="list-style-type: none"> - pN0(i-): no hay afectación metastásica ganglionar, IHQ negativa - pN0(i+): células tumorales en el ganglio linfático con tamaño >0.2mm (mediante histología o IHQ) - pN0(mol-): no hay afectación metastásica ganglionar mediante histología ni reacción en cadena de la polimerasa (PCR)/transcriptasa inversa (RT) - pN0(mol+): no hay afectación metastásica ganglionar histológica o IHQ pero sí mediante RT-PCR
	pN1	Micrometástasis ganglionares, o metástasis ganglionares en niveles I-III axilares, y/o cadena mamaria interna afectada con BSGC positiva no detectada clínicamente <ul style="list-style-type: none"> - pN1mi: micrometástasis (> 0.2mm y/o más de 200 células, pero ≤ 2.0mm) - pN1a: metástasis en ganglios axilares niveles I-III, al menos una metástasis >2mm - pN1b: metástasis en ganglios de la cadena mamaria interna con micro o macrometástasis detectadas en BSGC no detectadas clínicamente - pN1c: metástasis en ganglios axilares niveles I-III y cadena mamaria interna con micro o macrometástasis detectadas mediante BSGC no detectadas clínicamente
	pN2	Metástasis en 4-9 ganglios axilares, o afectación de la cadena mamaria interna detectada clínicamente en ausencia de afectación axilar ganglionar <ul style="list-style-type: none"> - pN2a: metástasis en 4-9 ganglios axilares (al menos uno de ellos >2.0mm) - pN2b: metástasis detectada clínicamente en la cadena mamaria interna en ausencia de afectación axilar ganglionar
	pN3	Metástasis en ≥ 10 ganglios axilares, o ganglios infraclaviculares (nivel III axilar), o metástasis ganglionar detectada clínicamente en cadena mamaria interna ipsilateral en presencia de uno ó más ganglios positivos en niveles I y II axilares, o <3 ganglios axilares y cadena mamaria interna con micro o macrometástasis detectadas mediante BSGC pero no detectadas clínicamente, o afectación de ganglios supraclaviculares ipsilaterales.

Tabla 6: Clasificación TNM: pN. Tabla adaptada de *Hortobagyi GN, Connolly JL, D'Orsi CJ, Edge SB, Mittendorf EA, Rugo HS, et al. Breast. In: AJCC Cancer Staging Manual [Internet]. 8th ed. Chicago: Springer International Publishing; 2017 [cited 2020 Jan 3]. p. 5*

Metástasis (M)	M0	No hay metástasis distante
	cM0 (i+)	Sin evidencia clínico-radiológica de metástasis a distancia a pesar de detectar células o depósitos ≤0.2mm en sangre periférica, médula ósea u otros tejidos no linfáticos lejanos por microscopía o técnicas moleculares, en ausencia de síntomas
	cM1	Metástasis distante clínico-radiológica (especificar localización)
	pM1	Metástasis confirmada histológicamente en órgano distante o metástasis >0.2mm en ganglios linfáticos no-regionales

Tabla 7: Clasificación TNM: M. Tabla adaptada de *Hortobagyi GN, Connolly JL, D’Orsi CJ, Edge SB, Mittendorf EA, Rugo HS, et al. Breast. In: AJCC Cancer Staging Manual [Internet]. 8th ed. Chicago: Springer International Publishing; 2017 [cited 2020 Jan 3]. p. 58*

Estadaje			
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T0	N1mi	M0
	T1	N1mi	M0
IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
IIIC	Cualquier T	N3	M0
IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

Tabla 8: Clasificación TNM: Estadaje. Tabla adaptada de *Hortobagyi GN, Connolly JL, D’Orsi CJ, Edge SB, Mittendorf EA, Rugo HS, et al. Breast. In: AJCC Cancer Staging Manual [Internet]. 8th ed. Chicago: Springer International Publishing; 2017 [cited 2020 Jan 3]*

1.3.5 Tratamiento

1.3.5.1 Introducción

El tratamiento del cáncer de mama debe individualizarse para cada paciente en un comité de tumores de mama formado por un equipo multidisciplinar.

Después del diagnóstico y clasificación del cáncer de mama, el tratamiento se basará principalmente en el estadio tumoral, aunque también deberán tenerse en cuenta otras características tanto de la paciente como del tumor, como son el estado menopáusico, el tipo histológico, la expresión o no de receptores hormonales y de HER2.^{52,53}

Los diferentes tratamientos que se pueden utilizar en el manejo terapéutico del cáncer de mama son la cirugía, la radioterapia, la quimioterapia, la hormonoterapia, terapias dirigidas e inmunoterapia.

El presente estudio se centra en pacientes con cáncer de mama con factores de buen pronóstico en las que el tratamiento con cirugía conservadora de la mama junto con radioterapia es en la actualidad de elección. Para estadificación axilar se utiliza la técnica de ganglio centinela si no existe sospecha clínico-radiológica preoperatoria de afectación axilar.

La hormonoterapia se recomienda utilizar de forma adyuvante en los casos con determinación del receptor de estrógenos de al menos un 10%, lo que se relaciona con el grupo de pacientes con cáncer de mama con factores de buen pronóstico. Los tratamientos neoadyuvantes, bien sea quimioterapia u hormonoterapia, ya establecidos para el cáncer de mama localmente avanzado, están ampliando sus indicaciones en el cáncer de mama en estadio inicial. Uno de sus beneficios es que si se produce una respuesta a estos tratamientos, disminuye el tamaño del tumor, por lo que se facilita la conservación de la mama.⁴⁶

1.3.5.2 Tratamiento quirúrgico

1.3.5.2.1 Historia de la cirugía de la mama

Los primeros datos acerca de la cirugía de la patología mamaria se sitúan en el Antiguo Egipto, en concreto en el papiro de Edwing Smith que data de unos 1600

Introducción

años a.C., donde los únicos métodos que podían utilizarse se basaban en quemar las lesiones con fuego o extirparlas con objetos cortantes.

La primera intervención quirúrgica sobre la mama que demostró mejorar los resultados en la supervivencia fue la mastectomía radical de Halsted, introducida a finales del siglo XIX.

Este tipo de intervención consistía en reseca la mama, la piel circundante, los músculos pectorales y los ganglios linfáticos a lo largo de la vena axilar hasta el ligamento costoclavicular. Se basaba en la creencia de que la diseminación de la enfermedad se producía de forma centrífuga y se cree que obtuvo buenos resultados en la época debido a que la mayoría de los cánceres de mama se presentaban avanzados localmente. Esta técnica se utilizó hasta los años 70.

Durante el siglo XX, encontramos dos hechos importantes para el desarrollo del tratamiento del cáncer de mama. Por un lado, el mayor conocimiento sobre la forma de diseminación de la enfermedad, y por otro, la introducción de la quimioterapia y la radioterapia en la práctica clínica.

Un punto de inflexión lo protagonizó Baclesse en 1960 en Francia al proponer la tumorectomía asociada a radioterapia en estadios iniciales.

De esta manera, junto con el diagnóstico precoz del cáncer de mama, la cirugía ha tendido a ser cada vez más conservadora asociando terapias complementarias.^{32, 54}

1.3.5.2.2 Cirugía conservadora de la mama

En estadios iniciales del cáncer de mama, el tratamiento quirúrgico es la primera intervención a realizar, tanto para proporcionar un control local de la enfermedad, como para determinar el estadio de los ganglios linfáticos.

En la actualidad, en el cáncer de mama inicial en estadios I-II, la cirugía conservadora asociada a radioterapia es el tratamiento de elección.⁴⁶

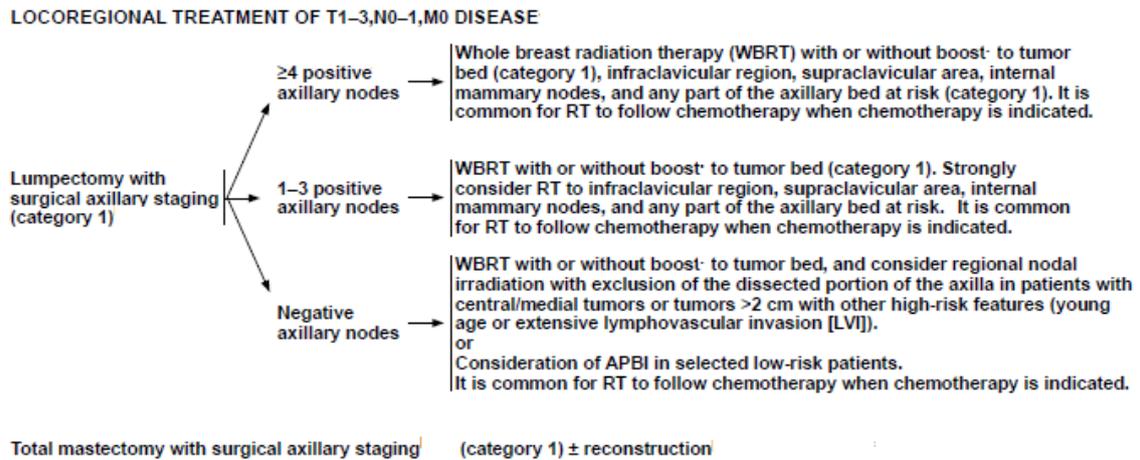


Figura 14: Tratamiento del cáncer de mama en estadios iniciales. Imagen adaptada de *National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Clinical Practice Guidelines in Oncology: Breast Cancer. Version 1. 2020. Disponible en: NCCN.org*. RT: radioterapia. APBI: irradiación parcial acelerada de la mama.

El tratamiento conservador se considera equiparable a la mastectomía, reservándose la misma para las siguientes situaciones: ^{1, 7, 8}

- Tumores grandes o con mala relación mama-tumor.
- Lesiones multicéntricas.
- Imposibilidad para conseguir márgenes libres de enfermedad después de resecciones múltiples.
- Contraindicación para la radioterapia
- Carcinoma intraductal extenso.

La indicación de mastectomía se acompaña del consejo de reconstrucción inmediata aunque se debe tener en cuenta la necesidad de tratamientos complementarios. La mastectomía contralateral profiláctica solo debe considerarse en pacientes portadoras de mutaciones en BRCA1/2 con valoración previa del riesgo.⁵⁵

Por su parte, la cirugía conservadora de cáncer de mama ha ido evolucionando para realizar técnicas cada vez menos agresivas que proporcionen mejores resultados estéticos sin perder de vista el control local de la enfermedad. De esta manera, se ha pasado de realizar cuadrantectomías a tumorectomías con márgenes libres. Además, se asocia cada vez más frecuentemente a técnicas de cirugía

Introducción

oncoplástica cuando se considera que el resultado estético pueda resultar desfavorable, principalmente cuando afecta a los cuadrantes internos e inferiores o cuando se prevé realizar una exéresis de más del 20-25% del volumen mamario.⁵⁶ Las técnicas oncoplásticas que pueden ser utilizadas son las siguientes:

- Técnicas de remodelación de volumen: colgajos glandulares o dermoglandulares.
- Técnicas de reposición de volumen: reducción mamoplástica o mastopexia asociadas o no simetrización contralateral.

Los márgenes de resección de la pieza en la cirugía conservadora del cáncer de mama se estudian mediante examen anatomopatológico perioperatorio y/o radiológico.⁵⁷

El estudio radiológico no puede sustituir al examen histológico, aunque se considera obligatorio en presencia de microcalcificaciones aisladas o distantes respecto a la lesión nodular. Suele realizarse mediante radiografía o si se precisa, con ecografía.⁵⁸

El estudio anatomopatológico de los márgenes de la pieza se considera libre de enfermedad si el carcinoma infiltrante no contacta con la tinta (tumor *on ink*) o si son mayores a 2mm en caso de presencia de carcinoma intraductal puro o carcinoma con microinvasión (sin focos invasivos mayores a 1mm).⁵⁹

Por su parte, en el caso de lesiones no palpables, debe realizarse su localización antes de la intervención quirúrgica. Para ello, podemos utilizar diferentes técnicas:⁴⁶

- Arpones colocados con guía ecográfica o estereotaxia.
- Inyección de un trazador isotópico en la lesión para posteriormente localizarla mediante sonda gammagráfica, asociando la posibilidad de detectar simultáneamente el ganglio centinela (técnica ROLL: *Radio Occult Lesion Localization* o técnica SNOLL: *Scintinel Node Occult Lesion Localization*).⁴⁶
- Inyección de semillas de I¹²⁵ en la lesión y detección con sonda gammagráfica.



Figura 15: Técnica de localización mediante arpón. *Elaboración propia*

1.3.5.2.3 Estadificación de los ganglios linfáticos

En el momento actual, el método de elección para la estadificación de la axila es la biopsia selectiva del ganglio centinela (BSGC). Está indicada su realización cuando la valoración clínica y ecográfica previas sean negativas. En caso contrario, estará indicado realizar linfadenectomía axilar de dos niveles, ampliada a nivel III si se detecta enfermedad palpable.^{1, 31, 32, 46}

Cabe destacar el papel de Giuliano et al.⁶⁰ en la evolución experimentada en el estudio axilar de las pacientes con cáncer de mama desde que en 1994 publicaran sus resultados tras la realización de la BSGC, con tasas de predicción del estado ganglionar, tras la realización de la curva de aprendizaje, del 100%.

El ganglio centinela es aquel ganglio o ganglios que reciben el drenaje linfático del tumor.

Es una técnica que posee una tasa de detección superior al 95% y una tasa de falsos negativos menor al 5%. Además, disminuye la morbilidad de la linfadenectomía.^{61, 62}

Introducción

Suele utilizarse un nanocoloide marcado con tecnecio-99m que se inyecta intratumoral, peritumoral, periareolar o subdérmico. Se asociará, si es posible, linfogammagrafía preoperatoria para guiar la cirugía.^{63,64}

La única técnica que permite estudiar el ganglio centinela en su totalidad de forma intraoperatoria es la técnica molecular OSNA (*One-Step Nucleic Acid Amplification Sysmex®*). Consiste en la amplificación de RNam de la citoqueratina 19 (CK19), correlacionándose su nivel de expresión con el volumen de la metástasis como se muestra a continuación: ⁶¹

Copias CK19	Resultado
>5000	Macrometástasis
250-5000	Micrometástasis
100-250	Células aisladas
<100	Negativo

Tabla 9: Método OSNA. *Elaboración propia*

Cuando el método OSNA no puede realizarse, es aceptable realizar el estudio intraoperatorio histopatológico mediante cortes por congelación. Los casos en los que no puede llevarse a cabo son los siguientes:

- El tumor no expresa CK19.
- El tumor muestra expresión heterogénea <30% en la BAG previa.
- El ganglio es menor de 50mg.⁶⁵
- El número de ganglios identificados superan el número de ganglios que se pueden analizar en una misma medición.⁶⁵
- No se dispone de la técnica.

En estos casos, el ganglio centinela no podrá analizarse en su totalidad de forma intraoperatoria, por lo que tendrá que completarse con estudio diferido.⁶¹

Actualmente, solo se consideran contraindicaciones para la BSGC el cáncer de mama infiltrante con ganglios citohistológicamente metastásicos (N1-2) y el carcinoma de mama inflamatorio (T4d).⁶⁶

Si el resultado de la BSGC es positivo existe controversia en el manejo terapéutico dependiendo de varios factores que se resumen a continuación según las recomendaciones del estudio ACOSOG Z011, Saint Gallen y la Sociedad Española de Patología Mamaria y Senología (SESPM):

EVITAR LINFADENECTOMÍA AXILAR EN GANGLIO CENTINELA METASTÁSICO	REALIZACIÓN DE LINFADENECTOMÍA AXILAR EN GANGLIO CENTINELA METASTÁSICO
<p>Valoración con OSNA: Baja carga tumoral total*: < 15.000 copias ARN m CK19</p>	<p>Valoración con OSNA: Alta carga tumoral total*: > 15.000 copias ARN m CK19</p>
<p>Valoración histopatológica: Células aisladas o micrometástasis Macrometástasis, si cumplen todo los criterios ACOSOG Z0011</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tumores T1-T2 • ≤ 2 ganglios centinela metastásicos • No invasión de la grasa periganglionar • Cirugía conservadora de la mama • Radioterapia (RDT) convencional adyuvante sobre mama (Irradiación de la mama con campos tangenciales optimizados a la axila) • Tratamiento sistémico adyuvante 	<p>Valoración histopatológica Macrometástasis en pacientes con mastectomía** Macrometástasis en pacientes con cirugía conservadora si:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tumores > T2 • > 2 ganglios centinela metastásicos • Invasión de la grasa periganglionar • Imposibilidad para la radioterapia postoperatoria de la mama • Quimioterapia u hormonoterapia neoadyuvante

Figura 16: Linfadenectomía axilar. Imagen adaptada de *Oncoguía SEGO: Cáncer infiltrante de mama. Guías de práctica clínica en cáncer ginecológico y mamario. Publicaciones SEGO; 2017*

Por lo tanto, el algoritmo de manejo en el tratamiento quirúrgico del cáncer de mama según las recomendaciones actuales de las diferentes sociedades puede resumirse como:

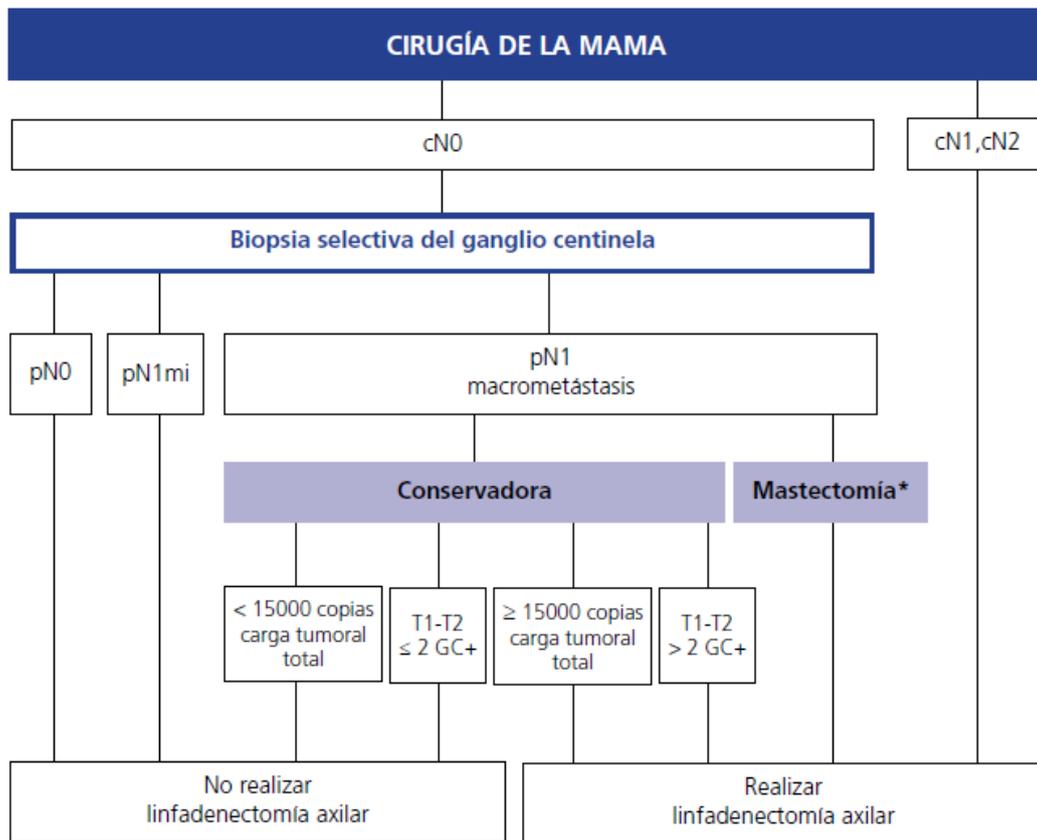


Figura 17: Algoritmo cirugía de la mama. Imagen adaptada de *Oncoguía SEGO: Cáncer infiltrante de mama. Guías de práctica clínica en cáncer ginecológico y mamario. Publicaciones SEGO; 2017*

1.3.5.2.4 Estudio anatomopatológico de la pieza quirúrgica

El informe anatomopatológico deberá valorar los siguientes parámetros: ⁶⁷

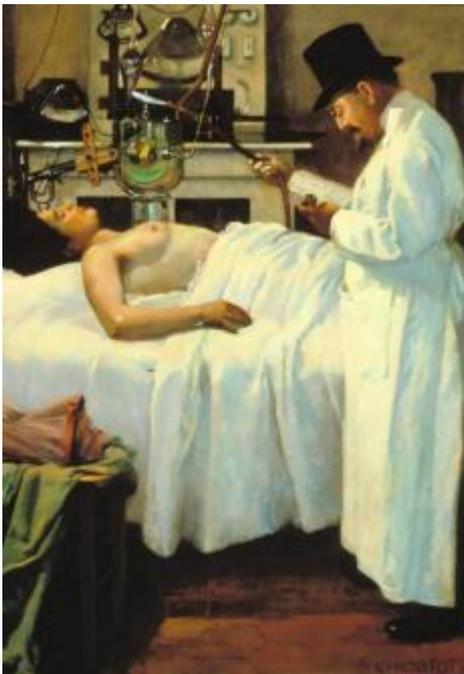
- Tamaño tumoral: distancia al margen más próximo, parénquima mamario y piel.
- Ganglioslinfáticos: número de ganglios extirpados, número de ganglios afectados, tamaño de la metástasis mayor
- Tipo histológico
- Grado histológico de Nottingham: valora diferenciación glandular (acinar)/tubular, pleomorfismo nuclear e índice mitótico.
- Multifocalidad
- Presencia de CIS
- Invasión linfovascular

- Estado de piel y complejo areola-pezón
- Márgenes quirúrgicos
- Presencia de microcalcificaciones
- TNM
- Receptores hormonales: estrógenos y progesterona
- Índice de proliferación celular Ki67
- HER2

1.3.5.3 Radioterapia

1.3.5.3.1 Historia de la radioterapia de la mama

El descubrimiento de los rayos X en 1895 por el alemán Wilhelm Konrad Roëntgen marca el inicio de la radioterapia. Posteriormente, en 1898, Marie Curie describe la radiactividad del polonio y del radio. De estos experimentos iniciales, de forma accidental, se evidencia la posibilidad de producir quemaduras por el radio, comenzando a utilizarse en el tratamiento de tumores.



*Primer Intento de Tratamiento de un
cáncer de mama con rayos X. 1907.
Georges Chicotot*

*Musée de l'Assistance Publique.
Hôpitaux de Paris*

Figura 18: Primer intento de tratamiento con rayos X. Imagen adaptada de Rodríguez A. *Radioterapia en el cáncer de mama [Internet]. Disponible en: www.seom.org*

Introducción

A partir de 1920, se establecen las bases de la radioterapia en cuanto a fraccionamiento y relaciones de dosis/respuesta. Una década después, Trump y Wright comienzan a utilizar fotones y electrones como tratamiento radioterápico.

Sin embargo, se considera que a raíz del desarrollo por Kerst en 1940 de una máquina que aceleraba electrones inducida por aumento del flujo magnético, podemos comenzar a controlar fácilmente los haces y empiezan a comercializarse los dispositivos de radioterapia para su uso clínico.^{68,69}

1.3.5.3.2 Tipos de radioterapia

La radioterapia externa constituye el tratamiento estándar en la actualidad, siendo un componente fundamental en el tratamiento del cáncer de mama que afecta tanto al control local como a la supervivencia. La irradiación de la mama completa tras la cirugía seguida de una sobredosificación limitada al lecho tumoral (*boost*) ha demostrado reducir las tasas de recidiva local, así como la supervivencia global y causa específica a los 15 años.

La dosis de radioterapia estándar es de 40.05 Gy a 2.67 Gy/fracción con dosis de sobreimpresión biológicamente equivalente a 16Gy. Cuando los márgenes están afectados se recomienda administrar una sobredosificación de 20Gy.

Sin embargo, gracias a un mayor conocimiento de la radiobiología tumoral, la tendencia actual consiste en utilizar técnicas de irradiación parcial acelerada, es decir, tratar el lecho tumoral con un margen en menor número de sesiones en un grupo seleccionado de pacientes, lo que proporciona una mejor tolerancia al tratamiento, confort y calidad de vida de las mujeres.^{1,70-80}

Las indicaciones de la irradiación parcial de la mama de la *American Society for Radiation Oncology* (ASTRO) y de la *European Society for Radiotherapy and Oncology* (ESTRO) son los siguientes:⁸¹

Factores	Criterios grupo «apropiado», ASTRO	Criterios grupo «bajo riesgo», GEC-ESTRO
<i>Paciente</i>		
Edad	≥ 60 años	> 50 años
Mutación BRCA 1/2	Ausente	No disponible
<i>Patológicos</i>		
Tamaño tumoral	≤ 2 cm	< 3 cm
Estadio T	T1	T1 o T2
Márgenes	Negativos (≥ 2 mm)	Negativos (≥ 2 mm)
Grado	Cualquiera	Cualquiera
Invasión linfovascular	No	No
Receptores estrogénicos	Positivos	Cualquiera
Multicentricidad	Solo unicéntricos	Solo unicéntricos
Multifocalidad	Unifocal, con tamaño total ≤ 2 cm	Unifocal
Histología	Ductal infiltrante, mucinoso, tubular y coloide	Ductal infiltrante, mucinoso, medular y coloide
Carcinoma intraductal puro	No permitido	No permitido
Carcinoma intraductal extenso	No permitido	No permitido
Carcinoma lobulillar in situ asociado	Permitido	Permitido
<i>Ganglionares</i>		
Estadio	pN0 (por LA o BSGC)	pN0 (por LA o BSGC)
<i>Tratamiento</i>		
Neoadyuvante	No permitido	No permitido

Figura 19: Indicaciones irradiación parcial. Imagen adaptada de *Rodríguez N, Murillo MT, González E, De la Fuente C, Moreno F. Irradiación parcial acelerada en cáncer de mama: revisión de las diferentes técnicas. Rev Senol Patol Mamar. 2014; 27(1):34-42*

Las modalidades que permiten realizar este esquema terapéutico en la actualidad son:

- Braquiterapia
- Braquiterapia intersticial multicatéter
- Braquiterapia intracavitaria mediante balón
- Radioterapia intraoperatoria (RIO)
- Radioterapia externa conformada tridimensional

Dentro de estas técnicas, destaca la RIO que permite irradiar únicamente un volumen limitado de la mama, principalmente el tejido próximo a la cavidad quirúrgica, ya que la mayoría de las recurrencias (en torno al 80%) se producen próximas a la localización del tumor primario (1-2 cm del lecho quirúrgico). La radiación se dirige de forma más directa, por lo que permite utilizar dosis superiores al tratamiento convencional en menor número de fracciones, reduciendo la duración del tratamiento y la exposición de órganos a riesgo.

Introducción

Existen 2 modalidades de RIO, la administración como refuerzo del tratamiento convencional de radiación (sobredosificación o *boost*) o su administración como modalidad de radiación única.

La RIO puede administrarse usando diferentes técnicas entre las que destacan, rayos X de bajo voltaje, como es el caso de la fuente utilizada en el presente estudio, o electrones.^{1, 70-82}



Figura 20: Administración de RIO. *Elaboración propia*

1.3.5.3.3 Estudios previos

Los dos grandes estudios randomizados que han liderado los resultados más prometedores en la aplicación del tratamiento de la RIO en las pacientes con cáncer de mama en los últimos años han sido ELIOT (*electron intraoperative radiotherapy*) y TARGIT (*targeted intraoperative radiotherapy*).^{70, 71, 78}

El estudio ELIOT, llevado a cabo en el Instituto Europeo de Oncología en Milán por el grupo de Veronesi, reclutó a un total de 1305 pacientes con edades

comprendidas entre los 48 y los 75 años con un tamaño tumoral máximo de 2.5cm para asociar a la cirugía conservadora del cáncer de mama o bien la radioterapia externa estándar o la RIO con electrones.

Las pacientes pertenecientes al grupo de la RIO recibieron una dosis de 21 Gy, mientras que aquellas pertenecientes al grupo de la radioterapia externa, recibieron 50Gy en 25 fracciones de 2Gy, seguido de una sobredosificación de 10Gy en 5 fracciones.

La tasa de recidiva local fue de 4.4% para las pacientes del grupo de la RIO y de 0.4% para las pacientes del grupo de la radioterapia externa con una media de seguimiento de 5 años. Sin embargo, si tenemos en cuenta únicamente un grupo de pacientes con factores de buen pronóstico, la tasa de recidiva local se situó en torno al 2%. La supervivencia a los 5 años fue similar en ambos grupos. El grupo que había recibido RIO presentó menos efectos secundarios relacionados con la piel.

El estudio TARGIT es un estudio multicéntrico que reclutó 3451 pacientes mayores de 45 años con tumores T1-2 menores a 3.5cm, N0-1 para asociar a la cirugía conservadora del cáncer de mama o bien la radioterapia externa estándar o la RIO con rayos X.

Las pacientes pertenecientes al grupo de la RIO recibieron una dosis de 20 Gy, mientras que aquellas pertenecientes al grupo de la radioterapia externa, recibieron de 40 a 56Gy en 15-25 fracciones, asociado o no a una sobredosificación de 10-16Gy en 5-8 fracciones.

La tasa de recidiva local fue de 3.3% frente a 1.3% si se había recibido RIO o radioterapia externa respectivamente. La supervivencia fue similar en ambos grupos.

Posteriormente, se han desarrollado otros estudios a partir del estudio TARGIT inicial, entre los que destacan el estudio TARGIT-US llevado a cabo en Estados Unidos desde 2012, el estudio TARGIT-R en 2016 por el grupo de Valente et al.⁸³ que analiza de forma retrospectiva los resultados del estudio previo, el estudio

Introducción

TARGIT-B desarrollado en Londres desde 2013 o el estudio TARGIT-C alemán desde 2014.

En conjunto, podemos decir que estos estudios han presentado tasas de recidiva local y de supervivencia equiparables al tratamiento con radioterapia externa en pacientes con factores de buen pronóstico.

Además, un reciente metaanálisis publicado por Vaydia et al.⁸⁴ ha demostrado beneficios de la RIO en términos de mortalidad asociada a la radioterapia no ligada a cáncer.

	ELIOT	TARGIT
Nº de pacientes	1305	3451
Edad	≥48-<75	≥45
Tamaño tumoral	≤2.5cm	≤3.5cm
RIO	21 Gy	20 Gy
Radioterapia externa	50 Gy (25 fraccionesx2Gy) + sobredosificación 10 Gy (5 fracciones)	40-56Gy (15-25 fracciones) +/- sobredosificación 10-16Gy (5-8 fracciones)

Tabla 10: Características TARGIT y ELIOT. *Elaboración propia*

Aunque es necesario ampliar el tiempo de seguimiento y realizar nuevos estudios para la consolidación de la RIO en el tratamiento del cáncer de mama con factores de buen pronóstico, actualmente, se considera una opción válida en pacientes seleccionadas.⁸²⁻⁹⁵

1.4 SISTEMA INMUNOLÓGICO

1.4.1 Generalidades

Las principales funciones del sistema inmunológico son la defensa frente a microorganismos y la inmunovigilancia frente a la aparición de tumores o de enfermedades autoinmunes o alérgicas.

Podemos clasificarlo en sistema inmune innato y adaptativo, aunque ambos realizan sus funciones de forma integrada ya que el sistema inmune innato activa al sistema inmune adaptativo y, a su vez, éste, utiliza los mecanismos de defensa del sistema inmune innato para llevar a cabo su función.^{96,97}

1.4.2 Sistema inmune innato

Constituye la primera línea de defensa y posee una especificidad limitada. Los componentes del sistema inmune innato reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y moléculas derivadas de células dañadas (DAMPs) a través de receptores de reconocimiento de patógenos (PRRs), mediante los cuales van a activar vías de señalización que producirán citoquinas y mediadores indispensables en la respuesta inflamatoria y en la inducción de la inmunidad adaptativa.⁹⁸

Sus principales componentes son:

- Epitelios y barreras químicas.
- Sistema del complemento: formado por proteínas inactivas circulantes en el plasma que se encargan de la lisis de microorganismos, la opsonización de patógenos, la producción de péptidos proinflamatorios, la solubilización de complejos inmunes y la activación de linfocitos B.
- Neutrófilos: son células de la línea mieloide que se encargan de la fagocitosis y la lisis de microorganismos.
- Macrófagos: son células circulantes o integradas en los tejidos que se encargan de la fagocitosis y la lisis de microorganismos para posteriormente convertirse en células presentadoras de antígenos. Además, secretan citoquinas con efectos proinflamatorios.

- Células *Natural Killer* (NK): son células de la línea linfoide que se encargan de destruir células que han sido infectadas por agentes intracelulares mediante la secreción de perforinas y granzimas, o bien utilizando un mecanismo llamado citotoxicidad dependiente de anticuerpos utilizado para reconocer y destruir células cubiertas por anticuerpos. Además, potencian la función fagocítica del macrófago produciendo interferón γ (IFN- γ). Las células NK tienen una importante función en la respuesta inmune antitumoral.
- Citoquinas o interleuquinas (IL): son proteínas secretadas por las células del sistema inmune para estimular el crecimiento y la diferenciación de los linfocitos con un papel fundamental en la inflamación. Su función se lleva a cabo tanto a nivel local como sistémico.^{96, 99, 100}

Efectos locales
- activación del endotelio (IL 1, TNF)
- quimiotaxis (IL 8)
- producción de anticuerpos (IL 6)
- activación de macrófagos (INF, IL12)
- activación de cel NK (IL 12)
Efectos sistémicos
- fiebre (IL 1, IL 6)
- proteínas de fase aguda (IL 6)
- shock séptico (TNF)

Figura 21: Efectos locales y sistémicos de algunas interleuquinas. Imagen adaptada de *Toche P. Visión panorámica del sistema inmune. Rev. Med. Clin Condes. 2012; 23(4): 446-57*

1.4.3 Sistema inmune adaptativo

Se caracteriza por mayor especificidad, especialización, diversidad y memoria. Reconoce las estructuras propias no reaccionando contra ellas. Está formado por linfocitos, que deben su gran variedad a tres tipos de receptores: las moléculas de histocompatibilidad (HLA), los receptores de los linfocitos T (TCR) y los receptores de los linfocitos B (BCR).

Podemos distinguir dos tipos de respuesta inmune:

- a) Inmunidad celular: mediada por linfocitos T es el principal mecanismo de defensa frente a antígenos intracelulares.

En un primer momento, el antígeno es expresado por una célula presentadora de antígeno, que puede ser una célula dendrítica o un macrófago, quien se encarga de transportarlo a los ganglios linfáticos. Posteriormente, se activa el linfocito T a través de su receptor (TCR), diferenciándose en linfocitos efectores o de memoria.

Los linfocitos T efectores van a migrar al sitio de infección o inflamación donde podemos diferenciar dos subpoblaciones dependiendo del tipo de molécula por el que se haya presentado el antígeno en la superficie de la célula presentadora de antígenos.

Si éste fue presentado por una molécula HLA de clase I, se diferencian linfocitos T citotóxicos CD8+ que actúan directamente sobre las células infectadas o tumorales y que finalmente darán lugar a la lisis de las células objetivo.

Si el antígeno fue presentado al linfocito por una molécula HLA de clase II, se diferenciarán linfocitos T colaboradores CD4+ que secretan IL para activar a los macrófagos y provocar la diferenciación de los linfocitos B. Los linfocitos T colaboradores CD4+ (helper) pueden diferenciarse a su vez en Th1 que liberan citoquinas del tipo IL2, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), IL12 y IFN γ , y en Th2 que van a liberar citoquinas tipo IL4, IL5, IL6 e IL13.⁹⁶

- b) Inmunidad humoral: mediada por anticuerpos secretados por linfocitos B es el principal mecanismo de defensa frente a antígenos extracelulares.

El linfocito B se activa en el ganglio linfático a través de su receptor (BCR) y, posteriormente, produce anticuerpos (inicialmente de tipo IgM). Si el linfocito es de tipo Th1 mediante la secreción de citoquinas va a producir un cambio en el isotipo de linfocito B quien, a su vez, secretará anticuerpos de tipo IgG, y si el linfocito es de tipo Th2, el linfocito B secretará anticuerpos de tipo IgE.^{96, 101}

La respuesta mediada por linfocitos B tiene importancia en relación con el cáncer porque estas células pueden funcionar igualmente como células presentadoras de antígenos.¹⁰² En estudios recientes se ha observado que un tipo específico de linfocitos B a los que se ha llamado reguladores producen factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) e IL10 favoreciendo la conversión de células T colaboradoras en reguladoras inmunosupresoras. El desarrollo de este tipo de linfocitos B reguladores está en relación con la secreción de TNF- α .¹⁰³

1.5 SISTEMA INMUNOLÓGICO FRENTE AL CÁNCER

1.5.1 Generalidades

La primera relación que fue descrita entre la interacción del sistema inmunológico con el desarrollo del cáncer fue hecha por el patólogo alemán Rudolf Virchow en 1863, quien objetivó la infiltración de células del sistema inmunológico en varios tipos de tumores. Posteriormente, Willian B. Coley, cirujano estadounidense, utilizó la administración de bacterias vivas en pacientes con tumores avanzados como medio para provocar una respuesta inmunológica eficaz frente al tumor, objetivando mejoría en la supervivencia. En esta misma línea, se desarrolló el bacilo de Calmette Guérin, utilizado en el tratamiento del cáncer de vejiga desde 1976.⁹⁷

La hipótesis de que las células tumorales son capaces de provocar una respuesta inmunológica en el huésped se basaba principalmente en que en el proceso de transformación maligna de estas células se forman antígenos que van a ser presentados en la superficie celular unidos al complejo mayor de histocompatibilidad induciendo una respuesta del sistema inmune adaptativo. Sin embargo, numerosos autores confrontaban esta idea argumentando que la repuesta inducida no era eficaz por varios motivos, entre los que destacan, que las células tumorales no poseen las señales de peligro necesarias, que las células tumorales son similares a las del tejido sano por lo que serían ignoradas o toleradas por el sistema inmune y que una activación sostenida del sistema inmune innato provocaría una respuesta inflamatoria que promovería el crecimiento tumoral sin una respuesta adaptativa eficaz.¹⁰⁴

Además, el desarrollo de otras terapias con resultados más eficaces frente al cáncer, hizo abandonar el estudio de la respuesta inmunológica frente al mismo durante décadas, hasta que en la década de los noventa, un mayor conocimiento de los mecanismos de acción utilizados por el sistema inmunológico frente al cáncer, así como una mayor disponibilidad de medios para la realización de ensayos clínicos con estas células, provocó un auge en el interés que el papel del sistema inmunológico tiene en el desarrollo del tumor.

El primer logro terapéutico derivado de esta línea de investigación se consiguió con la aprobación del anticuerpo anti-CTLA-4 (anti-*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*), ipilimumab, por la Food and Drug Administration (FDA) en 2011 para el tratamiento de pacientes con melanoma avanzado. Este nuevo agente terapéutico consiguió mejorar la respuesta inmune celular de los pacientes a los que se les administró con un perfil de inmunotoxicidad mejorado respecto a la quimioterapia o la radioterapia.^{97, 105}

1.5.2 La teoría de las tres E

Los diferentes mecanismos de acción que el sistema inmunológico posee frente al cáncer no son del todo conocidos hoy en día, pero podemos decir que sus acciones pueden tener un doble papel tanto en la protección del huésped como en el desarrollo del tumor.

La teoría de las tres E (Eliminación, Equilibrio y Escape) conocida como “Immunoediting” establece tres fases diferentes en la interacción entre el sistema inmunológico y el tumor.

En un primer momento, en la fase de eliminación, el sistema inmunológico es capaz de destruir el tumor antes de que sea aparente clínicamente. Esta fase puede desencadenarse por señales de peligro, DAMPs o ligandos de estrés. De esta manera, se activarían las células dendríticas y se liberarían citoquinas proinflamatorias para conseguir una respuesta del sistema inmune innato y un microambiente que facilite una respuesta adaptativa específica al tumor eficaz.

En la fase de equilibrio, aunque el tumor sea capaz de proliferar a pesar de la respuesta inmune, el sistema inmune adaptativo es capaz de mantener las células tumorales en un estado de inactividad.

En la última fase, la de escape tumoral, el sistema inmune no es capaz de reconocer las células tumorales y se produce el sobrecrecimiento del tumor (edición del tumor o inmunoeediting).¹⁰⁴

1.5.3 Mecanismos de escape del tumor

Para que se produzca el crecimiento del tumor, existen diferentes mecanismos de escape. Las células tumorales, sometidas a una intensa inmunovigilancia, pueden adquirir cambios, seleccionando las variables menos inmunogénicas, por lo que el sistema inmune no pueda reconocerlas. Además, el tumor puede también generar un estado de inmunosupresión por la secreción de citoquinas específicas o por la presencia de células inmunosupresoras del microambiente tumoral.^{98, 106}

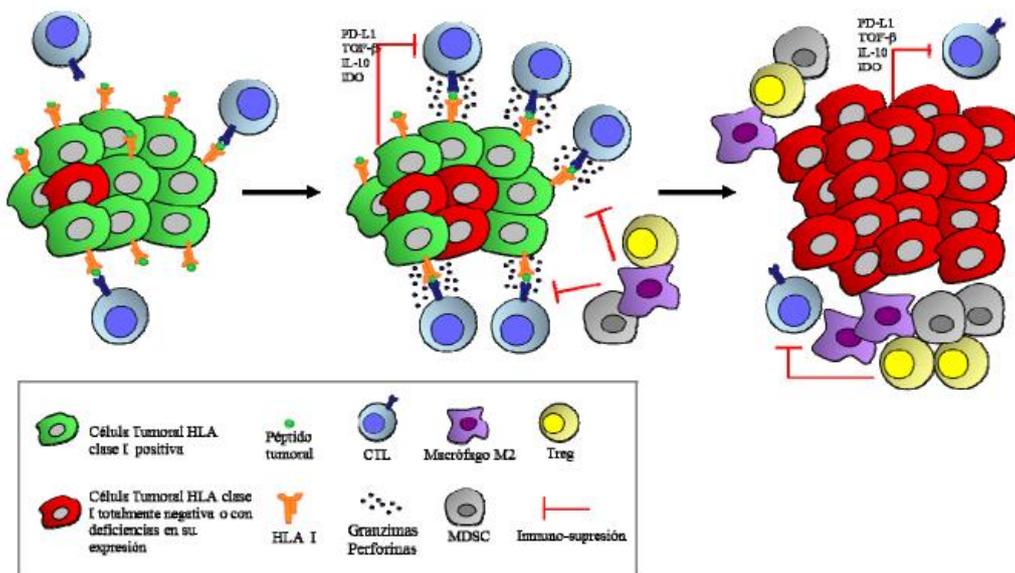


Figura 22: Mecanismos de escape tumoral. Imagen adaptada de Otero MJ, Sierra-Pérez R. *Inmunoterapia del cáncer. Realidades y perspectivas*. 1ª ed. Barcelona: Elsevier; 2015

1. Mecanismos intrínsecos de escape del tumor:

Uno de los mecanismos más conocidos de escape del tumor es la pérdida de expresión de antígenos HLA clase I, lo que convierte a las células tumorales en invisibles para el sistema inmune. Esta pérdida de expresión puede ser total, selectiva o alterando componentes relacionados con el procesamiento del antígeno.^{107,108}

Los tumores también pueden escapar del control del sistema inmunológico alterando las vías de los receptores responsables de la apoptosis de los linfocitos efectores antitumorales como son el ligando 1 de muerte programada (PD-L1), el ligando de la proteína Fas y galectinas.¹⁰⁹⁻¹¹¹

Por otro lado, los tumores pueden afectar el acceso de los linfocitos T al tumor alterando las moléculas de adhesión necesarias como las moléculas de adhesión intracelular (ICAM-1/2) o las moléculas de adhesión vascular 1 (VCAM-1).^{112, 113}

Otro mecanismo de escape tumoral objetivado en diferentes estudios es la expresión de CD47 en células dendríticas y macrófagos, lo que provoca una inhibición de la fagocitosis.¹¹⁴

Por último, el tumor también puede disminuir la expresión de coestimuladores afectando así a la respuesta inmunitaria, ya que un tumor que crece en un microambiente no inflamatorio, no conduce a una activación inmunitaria.

2. Mecanismos extrínsecos de escape del tumor: microambiente tumoral

Otra vía de escape del tumor puede ser promover un estado de inmunosupresión en el microambiente tumoral.¹⁰⁵ Este mecanismo puede llevarse a cabo por la secreción de citoquinas inmunosupresoras como TGF- β o IL10 o por la presencia de células inmunosupresoras del microambiente tumoral.

La interacción de las células del tumor con las células que forman parte del microambiente tumoral juega un papel fundamental tanto en la iniciación del cáncer como en la progresión del tumor.^{115, 116} Entre estas células con gran importancia para los mecanismos de escape tumoral distinguimos células del sistema inmunitario tanto innato como adaptativo con actividad supresora y células del estroma como los fibroblastos.

Por otro lado, la matriz extracelular está implicada en los procesos de desarrollo del cáncer. En el cáncer de mama, un aumento en la expresión de integrinas y metalopeptidasas en la matriz extracelular se relaciona con un peor pronóstico y mayor recurrencia.⁹⁷

2.1 Células de origen linfoide: linfocitos T reguladores.

Uno de los principales mecanismos de escape tumoral mediado por linfocitos T reguladores es la producción de TGF- β e IL10 que van a crear un ambiente inmunosupresor que altera la función de los linfocitos T citotóxicos inhibiendo la liberación de gránulos citolíticos. Además, promueven, también mediante la liberación de estas citoquinas, la inhibición de la presentación antigénica por las células dendríticas.^{104, 116}

2.2 Células de origen mieloide:

Las células mieloides forman parte del estroma tumoral y tienden a crear un microambiente inflamatorio crónico.^{97, 117}

1) Macrófagos:

Los macrófagos pueden dividirse en tipo M1 que liberan citoquinas proinflamatorias como TNF- α que van a favorecer una respuesta citotóxica antitumoral eficaz o tipo M2 que liberan citoquinas tipo IL4 que favorecen la progresión del tumor.¹¹⁸

El cambio de un tipo de macrófago a otro está en relación con el menor nivel de oxígeno observado en los tumores y mediado por quimioquinas como la endotelina-2 o factores de crecimiento como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que atraen a los macrófagos.

Estos macrófagos asociados a tumores (TAM) están estrechamente relacionados con la progresión del tumor mediante la liberación de citoquinas, como IL4, IL10, TGF - β , o factores de crecimiento.^{119, 120}

2) Células mieloides supresoras:

Las células mieloides supresoras asociadas a los tumores son células mieloides con un fenotipo más inmaduro que generan la supresión de la respuesta inmunitaria promoviendo la vascularización tumoral y

bloqueando la función de las células dendríticas como células presentadoras de antígenos, la activación de los linfocitos T, la polarización de los macrófagos de tipo M1 o la actividad citotóxica de las células NK.¹²¹

3) Células dendríticas:

Las células dendríticas presentes en el microambiente tumoral pueden ser células dendríticas funcionalmente dañadas por el tumor en su proceso de diferenciación que les impide desarrollar una respuesta inmune adaptativa eficaz al perder su capacidad de presentación antigénica.¹²²

2.3 Fibroblastos asociados al cáncer (CAFs):

Los CAFs son fibroblastos con características diferentes a los del tejido sano. Son los principales productores de la matriz extracelular, por lo que controlan el tráfico de células T desde el margen invasivo del tumor hacia el estroma. Se activan mediante factores como TGF- β y favorecen la producción de diferentes factores de crecimiento.¹²³

Se ha objetivado que en ratones sin este tipo de fibroblastos se produce una regresión del tumor mediante un mecanismo dependiente de la inmunidad del huésped, liderado principalmente por IFN- γ y TNF- α .¹²⁴

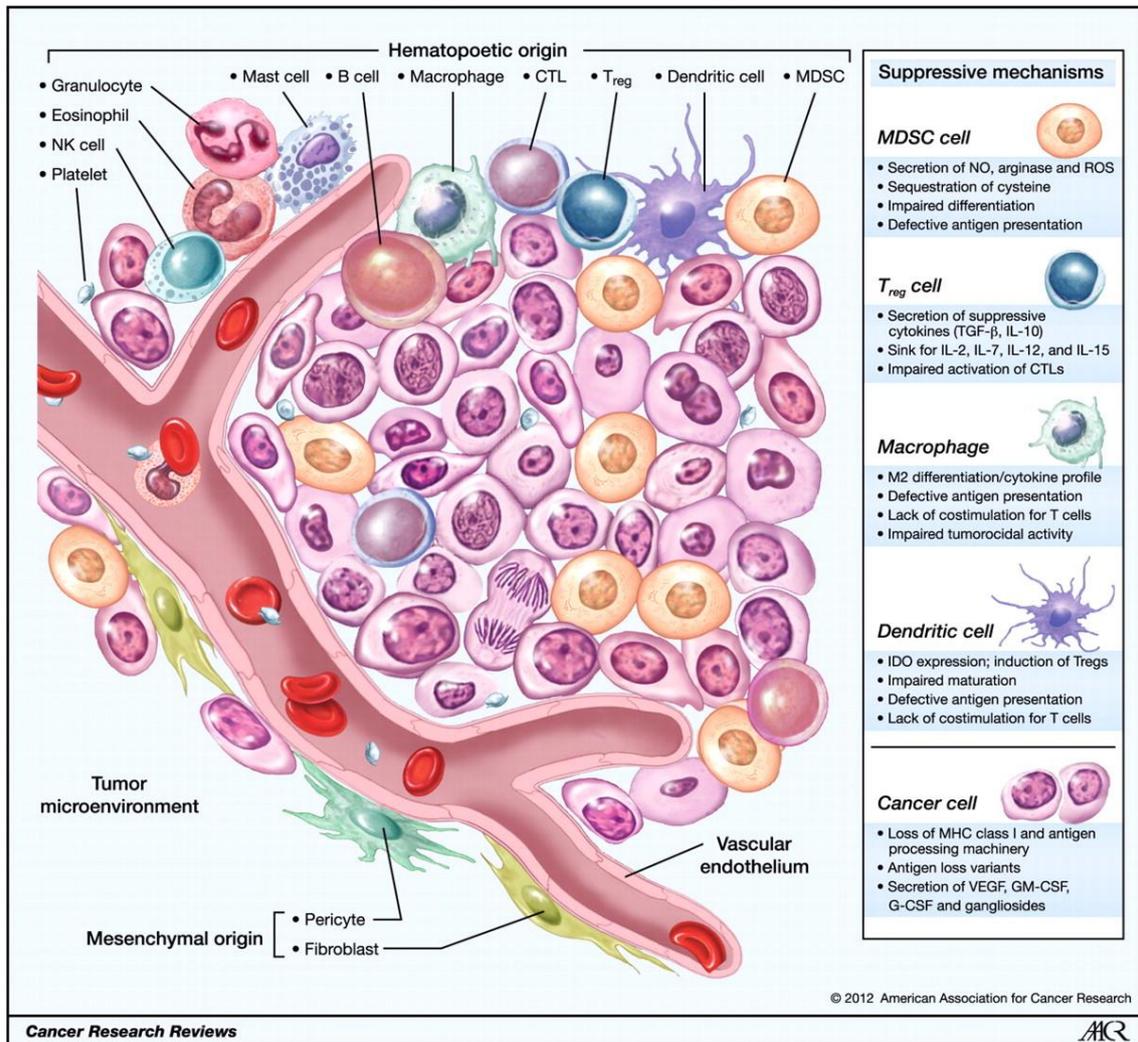


Figura 23: Infiltrado celular en el microambiente tumoral. Imagen adaptada de Kerkar SP, Restifo NP. *Cellular constituents of immune escape within the tumor microenvironment. Cancer Res. 2012;72(13):3125-30*

1.5.4 Invasión y Metástasis

Si el tumor consigue evadir al sistema inmunitario y pasar a la etapa de escape, las células tumorales pueden entrar en la circulación sanguínea o linfática y pasar a invadir otros órganos.

El primer paso para la invasión se conoce como transición epitelio-mesenchimal (EMT). Las células tumorales pierden los marcadores de origen epitelial (E-cadherina) y adquieren los de origen mesenchimal (N-cadherina).

Mediante estos marcadores, las células poseen mayor motilidad y capacidad migratoria mediante la liberación al medio de enzimas que degradan la matriz

extracelular. Las moléculas descritas relacionadas con este proceso son TGF- β , TNF- α , IL6, IL1 e IL8.¹²⁵

1.5.5 Inflamación y cáncer

La inflamación está en clara relación con la carcinogénesis, quedando establecido que la inflamación crónica en un tumor va a favorecer el crecimiento de las células neoplásicas. Uno de los ejemplos más claros es el desarrollo de hepatocarcinoma a través de un proceso inflamatorio mediado por IL6 en los pacientes con cirrosis hepática.^{97, 126}

Aunque una respuesta inflamatoria aguda entendida como una respuesta del sistema inmune innato es necesaria para el desarrollo de una respuesta inmune adaptativa eficaz, la inflamación crónica se relaciona con la iniciación del cáncer generando estrés, con su desarrollo por promover la proliferación celular y su progresión al producir angiogénesis e invasión tisular.

Sin embargo, actualmente se entiende que la inflamación y la respuesta inmune son procesos conectados. Un ejemplo de ello son los numerosos estudios que relacionan las moléculas inflamatorias interleuquina 1 beta (IL1 β) y TNF- α con la inducción de la respuesta inmunitaria en diferentes momentos del desarrollo del tumor.^{104, 127-134}

Además, con el nuevo conocimiento sobre la respuesta del sistema inmunitario sobre el desarrollo del cáncer, se considera de vital importancia, en estos momentos, en el inicio y posterior desarrollo de los tumores, las células que forman parte del microambiente tumoral, en relación directa con los procesos inflamatorios.

Una característica principal implicada en el desarrollo del tumor es que en estos tejidos evidenciamos un bajo nivel de oxígeno o hipoxia lo que conlleva la secreción de citoquinas y quimioquinas que en primer lugar favorecen el reclutamiento del sistema inmunológico.

Las células del sistema inmunitario del estroma del tumor, así mismo, liberan citoquinas y factores como TGF- β que, por su parte, favorece un ambiente inmunosupresor y angiogénesis.^{135, 136}

Introducción

Las citoquinas inflamatorias como IL6, IL1 β o IL22 activan el factor de transcripción transductor de señales y activador de transcripción 3 (STAT3) y factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NFkB) en las células tumorales lo que conlleva inhibición de la apoptosis de las mismas mediada por TNF- α .¹³⁷ La IL1 β , que es secretada por las células tumorales, también puede producir angiogénesis.

Por otro lado, la expresión de quimioquinas como CXCL9 y CXCL 10, ligandos de CXCR3, se relaciona con mayor infiltración de linfocitos T CD8+ del tumor (TILs) que mejora el pronóstico en pacientes con cáncer como el de mama.^{105, 138}

Por lo tanto, la relación entre inflamación y respuesta inmunitaria frente al cáncer es compleja, observándose en diferentes moléculas funciones antitumorales y carcinogénicas dependiendo de la fase de desarrollo del tumor.

1.6 EL MICROAMBIENTE TUMORAL DESPUÉS DE LA RADIOTERAPIA

1.6.1 Generalidades

La radioterapia constituye hoy en día una de las bases del tratamiento a nivel local de cerca del 50% de los tumores, con altas tasas de eficacia. El deseo de mejorar los resultados de respuesta de los tumores frente a la radiación, nos ha hecho estudiar con mayor profundidad los mecanismos que están implicados en el daño relacionado con la radiación y la reparación tanto de células neoplásicas como de células sanas alrededor del tumor.

Históricamente, la investigación en torno a la radioterapia se basaba únicamente en el daño que ésta ejercía de forma directa sobre el DNA de la célula tumoral. La radioterapia era considerada un tratamiento inmunosupresor, como podemos constatar por su uso en la preparación para trasplantes alogénicos con la irradiación completa del cuerpo.

Sin embargo, la investigación actual ha evidenciado que la radioterapia puede inducir respuestas antitumorales sistémicas mediadas por el sistema inmunológico. Un concepto clave para el entendimiento de estos mecanismos es el hecho de que la radioterapia también influye en el microambiente tumoral, las

células que forman parte del estroma tumoral con las que el tumor posee complejas interacciones biológicas.^{139, 140}

1.6.2 Las 6 Rs de la radiobiología

La radiobiología va a estudiar los efectos que la radioterapia tiene en los mecanismos biológicos del tejido irradiado.

En el modelo clásico de la radiobiología se establece que los efectos citotóxicos que la radiación produce en las células tumorales se basan en el daño sobre el DNA, bien sea por acción directa o indirecta por radicales libres, que pueden llevar a una aberración cromosómica que produzca finalmente alguna forma de muerte celular como necrosis o apoptosis. Los factores que pueden influir en esta respuesta a la radioterapia se han conocido como las 4 Rs de la radiobiología:

- Reparación: hace referencia a la capacidad para reparar el daño ejercido sobre el DNA de la célula tumoral.
- Redistribución: la radiosensibilidad que la célula tumoral tiene a la radioterapia depende de la fase del ciclo en la que se encuentra. De esta manera, las células en fase de mitosis responden mejor al tratamiento.
- Repoblación: hace referencia a la repoblación a partir de las células tumorales supervivientes.
- Reoxigenación: las áreas bien oxigenadas del tumor poseen mayor sensibilidad a la radiación.

La quinta R haría referencia a la radiosensibilidad que varía por características intrínsecas del tumor o el individuo y que se vería alterada por la manipulación de los factores mencionados anteriormente.

En el contexto del microambiente tumoral y la respuesta inmunológica antitumoral, el modelo de la radiobiología clásico muestra una visión limitada. De esta manera, algunos autores han propuesto la inclusión de una sexta R que hace referencia a la reactivación del sistema inmune en respuesta a la radioterapia.^{141,}

142

1.6.3 Efectos de la radioterapia en el microambiente tumoral

1.6.3.1 Efectos en la respuesta inmunológica

El daño producido en el DNA de las células tumorales por la radioterapia va a activar, como hemos visto, mecanismos de reparación que pueden ser reconocidos por el sistema inmunológico innato como DAMPs a través de sus PRRs. Una de las moléculas relacionadas con el daño al DNA de las células tumorales es una quinasa conocida como ATM que podría ser el desencadenante para dicha activación. Este mecanismo activaría la función del sistema inmunológico innato que podría determinar una respuesta inmune adaptativa posterior y muerte celular.¹⁴¹

La muerte celular inmunogénica es un tipo peculiar de apoptosis que implica el reclutamiento del sistema inmune del huésped como contribuidor a la respuesta a la radioterapia, resultando en memoria inmune y efectos sistémicos ventajosos.

Al contrario de la forma convencional de apoptosis de las células, en este caso, las células cancerosas expuestas a radioterapia mueren mientras emiten señales que estimulan a las células presentadoras de antígenos y la diferenciación para llevar a cabo la respuesta inmune adaptativa.

Esta muerte celular inmunogénica obligatoriamente implica:

- La exposición en la superficie celular de la calreticulina.
- La secreción de trifosfato de adenosian (ATP).
- La secreción de proteína 1 del grupo de alta movilidad (HMGB1).

La muerte celular inmunogénica intensifica la activación y procesamiento por parte de las células dendríticas de antígenos derivados del tumor, la secreción de IL1 β y TNF- α que promueven más eventos proinflamatorios, la disminución de la IL10 con efectos inmunosupresores y la secreción de quimiocinas como CXCL10 que van a comportar el reclutamiento de linfocitos T citotóxicos en el microambiente tumoral.¹⁴⁰⁻¹⁴³

Otros mecanismos desencadenados por la radioterapia en la respuesta inmunológica son la modulación de la expresión de moléculas de HLA clase I para el

reconocimiento de las células tumorales por parte de los linfocitos T citotóxicos o la expresión de moléculas coestimuladoras de los mismos.^{141, 142}

Por lo tanto, gracias a la radioterapia podemos decir que el tumor irradiado se convierte en una vacuna *in situ* por mejorar la capacidad de reconocimiento del sistema inmunológico de las células tumorales y desarrollar una respuesta inmunológica tanto innata como adaptativa eficaz.^{139, 141, 142}

Además, los efectos de la radioterapia en el sistema inmunológico tienen efectos en las células próximas a las células irradiadas, lo que se conoce como efecto de vecindad (bystander), y en las células distantes al tumor, conocido como efecto de vecindad de largo alcance (abscopal), demostrando efectos sistémicos.¹⁴⁴

Cuando se produce la muerte celular inmunogénica, activada como una respuesta al daño en el DNA de la célula tumoral, ésta muere secretando factores citotóxicos como las especies reactantes de oxígeno que pueden promover también la muerte de las células vecinas, no irradiadas o radorresistentes (efecto de vecindad). Además, como hemos visto, activan el sistema inmunológico emitiendo señales para activar a los linfocitos T citotóxicos. Los efectos de esta activación se han documentado a distancia (efecto de vecindad de largo alcance), en células no incluidas en los campos de radioterapia, con la regresión de metástasis en modelos de ratones pero también en humanos como destaca un caso publicado de un paciente con melanoma metastásico tratado con radioterapia local e ipilimumab, anticuerpo que bloquea CTLA4, inhibidor de la activación de linfocitos T citotóxicos, observándose un verdadero efecto de vecindad de largo alcance con la regresión de las metástasis.^{142, 144-148}

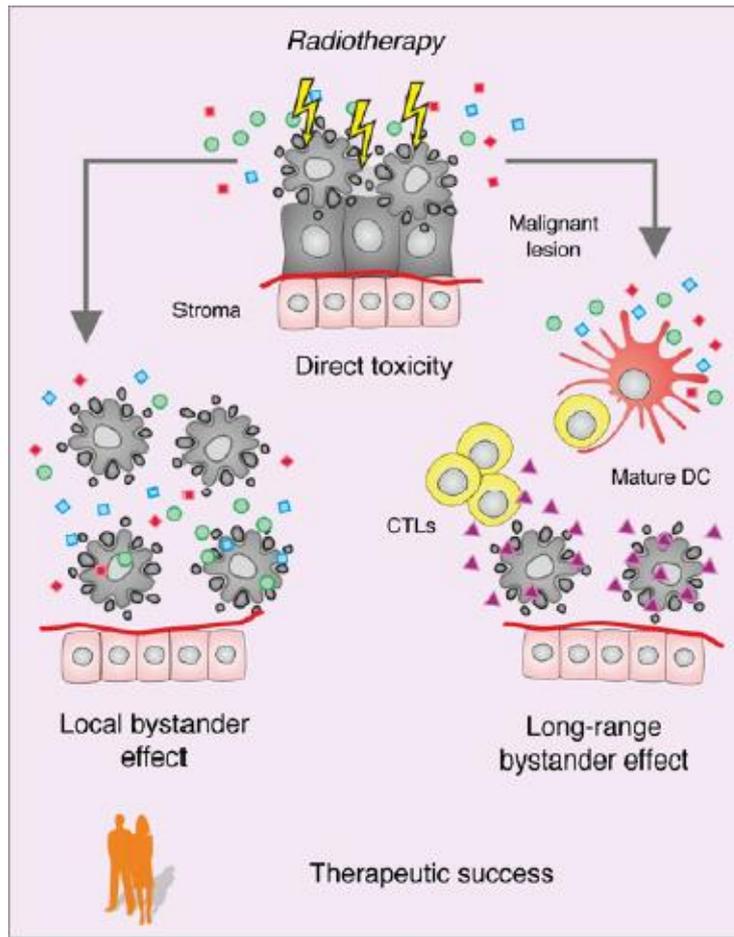


Figura 24: Efecto de vecindad (bystander) y efecto de vecindad de largo alcance (abscopal). Imagen adaptada de Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. *Immunogenic cell death in radiation therapy. Oncoimmunology. 2013;2(10):e26536.*

Por otro lado, se ha visto que la radioterapia también promueve efectos inmunosupresores como la activación de linfocitos T reguladores, la infiltración del tumor por células mieloides supresoras o la maduración de macrófagos M2.^{140, 149-152}

Sin embargo, en estudios recientes se ha objetivado una remisión de la función de estas células mediado por un mecanismo de infiltración de linfocitos T citotóxicos en respuesta a la radioterapia.¹⁵³

La irradiación del tumor puede provocar un aumento de la infiltración del tumor de linfocitos T citotóxicos, convirtiendo un tumor con pobre respuesta inmunogénica (cold tumor o tumor frío) en uno con una respuesta adaptativa eficaz frente al tumor (hot tumor o tumor caliente). Una única dosis de

radioterapia de 20 Gy producía una regresión del tumor y un aumento en su infiltración por linfocitos T citotóxicos en ratones, mientras que en ratones con deficiencia en la producción de linfocitos T, los tumores se hacían radiorresistentes y crecían progresivamente.^{143, 154}

Este nuevo concepto que ha supuesto la investigación de los efectos proinmunogénicos de la radioterapia, nos ha llevado a diferenciar dos tipos diferentes de tumores, basado en la rica o pobre infiltración de linfocitos T. Lamentablemente, la mayoría de los tumores al diagnóstico se presentan como tumores fríos con escasa infiltración de linfocitos T.

La falta de infiltración de células T puede ser debida a la ausencia de células dendríticas o a la presencia de células dendríticas no activadas. En esta situación, las células T antitumorales no se generan. En otras situaciones las células T antitumorales que son generadas espontáneamente o por otros tratamientos como la inmunoterapia son excluidas por la barrera vascular la cual es inducida por macrófagos asociados al tumor tipo M2. La radiación puede promover la activación de las células dendríticas y su migración a los nódulos linfáticos de drenaje del tumor donde activan los linfocitos T específicos. Estos linfocitos T pueden entonces migrar al tumor, realizar su función citotóxica y secretar citoquinas que van a activar células dendríticas y promover la diferenciación de los macrófagos en antitumorales o de tipo M1. Se ha visto que con bajas dosis de radiación se puede promover esta diferenciación de los macrófagos hacia fenotipo antitumoral, permitiendo a las células T que ya existían, infiltrar el tumor.

Por lo tanto, la radioterapia presenta un nuevo papel convirtiendo tumores no respondedores a la respuesta inmunológica en otros que sí lo hacen. Además, la radioterapia es parte del tratamiento estándar de muchos tipos de tumores, lo que la hace una herramienta muy útil.

Sin embargo, se ha visto que la radioterapia en ocasiones no es suficiente de manera aislada para desarrollar esta infiltración de linfocitos T citotóxicos en el tumor debido a barreras inmunosupresoras expresadas por el propio tumor como TGF- β . Estas barreras pueden ser compensadas asociando la radioterapia a

tratamientos de inmunoterapia desarrollados a partir del conocimiento de los mecanismos de acción de la respuesta inmunológica.^{139, 140}

1.6.3.2 Efectos en el estroma: fibrosis

La fibrosis consiste en la formación en exceso de tejido conectivo caracterizada por la producción aumentada de proteínas de la matriz extracelular y la acumulación de fibroblastos activados durante el proceso de cicatrización.^{155, 156} Los CAFs conforman el grupo mayoritario de células que forman parte del estroma en la mayoría de los tumores.¹⁴⁰

Aunque la fibrosis puede detectarse años después de la exposición a la radiación, el TGF- β es el componente regulador principal de la fibrosis desde sus fases iniciales,^{155, 157-159} habiéndose demostrado su relación con la fibrosis inducida después de la radiación en pacientes.^{155, 160}

Li et al.¹⁶¹ objetivaron en su estudio que los niveles de TGF- β en suero eran significativamente mayores en aquellas pacientes que posteriormente desarrollaron fibrosis moderada o severa, estableciendo que valores superiores a 96 pg/ml en suero después de la cirugía y previo a la radioterapia tenían una sensibilidad del 76% y una especificidad del 74% para el desarrollo de esta complicación. Además, concluyen que debido a que las pacientes a estudio presentan estadios iniciales de cáncer de mama con tamaños tumorales pequeños, los niveles alterados de TGF- β encontrados pueden ser atribuidos a una variabilidad genética propia del individuo sin verse afectado por las propias células tumorales. Por su parte, Boothe et al.¹⁶² demostraron que los valores de TGF- β en suero sirven como marcador temprano para predecir la fibrosis tanto después de la cirugía y previo al tratamiento con radioterapia, como posteriormente a la misma. Así mismo, los autores concluyen que los valores encontrados no se vieron alterados por la aplicación de la radioterapia.

Por lo tanto, TGF- β constituye una citoquina involucrada en diferentes procesos como la fibrosis relacionada con la radiación, aumentando la producción de proteínas de la matriz extracelular y la acumulación de fibroblastos diferenciados.^{155, 156}

1.7 LA RIO EN EL ESTUDIO DEL MICROAMBIENTE TUMORAL

1.7.1 Generalidades

La RIO asociada a la cirugía conservadora ha supuesto un avance en el tratamiento del cáncer de mama, con resultados publicados equivalentes al tratamiento radioterápico convencional en términos de supervivencia y toxicidad de los tejidos sanos, añadiendo el beneficio de la mejora en la calidad de vida de las pacientes por la menor duración del tratamiento.⁹²

La recurrencia local en el cáncer de mama es la causa principal de muerte en relación con el cáncer en estas pacientes. Los restos de células tumorales que quedan después de la cirugía se encuentran principalmente en el lecho quirúrgico, estableciéndose un límite que habitualmente llega hasta 1cm de distancia desde el borde de resección. La recurrencia local ocurre con más frecuencia en el área que rodea al tumor primario y existe más riesgo con cirugías más conservadoras.^{88, 163}

Todo ello, hace pensar que la cirugía representa un factor favorecedor del desarrollo de metástasis por sí misma en humanos, como ya se ha demostrado en modelos animales. Estudios in vitro han objetivado que la cirugía modifica el microambiente local pudiendo alterar la cinética de crecimiento de las células tumorales, principalmente por el proceso de cicatrización iniciado posteriormente al procedimiento quirúrgico a través de las citoquinas. Todo ello estaría en consonancia con la hipótesis de Sir Stepehn Paget descrita en 1889 sobre las células tumorales y el microambiente (“seed and soil”) como elementos que interactúan en el desarrollo de los tumores.^{88-90, 164-166}

Sin embargo, se han realizado estudios que sostienen que la radioterapia puede afectar tanto a la supervivencia de las células cancerígenas como al microambiente local alterando la cinética de crecimiento de dichas células, contrarrestando el efecto de la cirugía.⁷³

La RIO constituye la primera técnica que permite radiar el lecho tumoral en el mismo momento que la cirugía exéretica del cáncer de mama y ofrece la posibilidad de estudiar el efecto de la radioterapia en el microambiente tumoral en humanos in vivo.⁸⁸

1.7.2 Efectos de la RIO en el microambiente tumoral

1.7.2.1 Efectos en la respuesta inmunológica

Numerosos estudios se están llevando a cabo para identificar los efectos biológicos de la RIO, ya que los conocimientos que tenemos de los efectos y mecanismos de acción de esta terapia en las células tumorales y el microambiente tumoral es todavía limitado.

La cirugía promueve un estado de inflamación en el proceso de cicatrización que se relaciona con la promoción del tumor. El débito del drenaje quirúrgico tras la cirugía conservadora del cáncer de mama es rico en citoquinas, quimiocinas y metaloproteinasas de la matriz extracelular. Su composición, asociado a células del microambiente tumoral como los macrófagos asociados a tumores y los factores que estas células secretan, como IL1 β o TNF- α , promueven el crecimiento del tumor, así como la transición epitelio-mesenquimal de las células tumorales como primer paso para la invasión a otros órganos.⁸⁹⁻⁹⁴

Krall et al.¹⁶⁷ objetivaron que un tratamiento antiinflamatorio perioperatorio reducía el crecimiento del tumor y la aparición de metástasis en cáncer de mama. Por su parte, Dong et al.¹⁶⁸ demostró la conexión entre la actividad inflamatoria y la transición epitelio-mesenquimal, al observar que TNF- α induce esta transformación en células de cáncer de mama. Además, Santiesteban et al. observaron como los linfocitos T CD8⁺ activados en la respuesta inflamatoria en cáncer de mama en ratones podían inducir esta transformación y que, después de su activación, adquirirían un fenotipo de células madre descrito por Al-Hajj et al.¹⁶⁹ y caracterizado por presentar CD44⁺/CD24^{low}, que era más agresivo y promovía el crecimiento del tumor.¹⁷⁰

Segatto et al.¹⁷¹ objetivaron que los fluidos de la herida quirúrgica de las pacientes intervenidas de cáncer de mama estimulaban con mayor intensidad el desarrollo de las células tumorales del cáncer de mama que el factor de crecimiento epidérmico, utilizado habitualmente como estándar. Además, este efecto se realizaba induciendo la señal de STAT3, ya que el efecto disminuía en presencia de inhibidores del mismo, que se relaciona con la promoción del tumor.

El microambiente tumoral después de la cirugía conservadora de cáncer de mama es, por tanto, desfavorable para la respuesta inmune antitumoral, lo que parece que puede revertirse con la RIO.

La RIO podría mejorar los efectos biológicos de la radioterapia estándar por no existir intervalo libre de administración para la reparación de las células tumorales y su proliferación, como ya se ha demostrado en modelos animales, sugiriendo que la administración de radioterapia inmediatamente después de la cirugía, como es el caso de la RIO, podría representar una medida más efectiva para reducir la recurrencia local. Estos hallazgos están en consonancia con las bajas tasas de recurrencia publicadas tras esta terapia, bien sea administrada como modalidad de radiación única o como *boost*.^{88, 92, 172-174}

El estudio publicado por el grupo de Belletti et al.⁸⁸ comparó el valor obtenido de diferentes proteínas involucradas en la respuesta del microambiente tumoral después de la aplicación de la RIO utilizando 3 mezclas de muestras diferente. Por un lado, una mezcla de suero preoperatorio tanto de las pacientes que habían recibido RIO como de las que no lo habían hecho, por otro lado, débito de drenaje quirúrgico a las 24 horas desde la cirugía de pacientes que habían recibido la RIO y, por último, de aquellas que no la habían recibido.

Las células de cáncer de mama que se habían aislado de los fluidos de los drenajes en las pacientes a las que después de la cirugía se les había administrado RIO a una dosis de 20 Gy, presentaban menor migración, capacidad de invasión y proliferación en comparación con las células reclutadas de drenajes de pacientes a las que se les había operado pero no administrado RIO.^{88, 91}

Así mismo, el análisis de las proteínas secretadas en estos débitos de drenaje mostraron una disminución en citoquinas como IL6 involucradas en el crecimiento tumoral y en la motilidad en los casos en que se había administrado RIO.⁸⁸

Decreased by TARGIT	Increased by TARGIT
Angiogenin	AgRP
FIt-3 ligand	EGFR
IL-10	FAS/TNFRSF6
IL-6	FGF-4
IL-7	G-CSF
Leptin	IGFBP-6
MCP-1	IL-13
MCP-2	IL-4
RANTES	IL-5
PDGF-BB	Mip-1d
GRO	
HGF	
IL-8	
Mip-1a	
sTNFR-II	
sTNFR-I	
uPAR	
VEGF-R3	
Tie-1	
Tie-2	

Figura 25: Proteínas del fluido de la herida quirúrgica alteradas por la RIO. Imagen adaptada de *Belletti B, Vaidya J, D’Andrea S, Entschladen F, Roncandin M, Lovat F, et al. Targeted intraoperative radiotherapy impairs the stimulation of breast cancer cell proliferation and invasion caused by surgical wounding. Clin Cancer Res. 2008; 14(5):1325-32*

Por otra parte, Zaleska et al.⁹⁰ demostraron que la RIO en cáncer de mama podía contrarrestar el efecto de la cirugía en la expresión de algunos microRNAs relacionados con el desarrollo del tumor vía IL6-STAT3.

La radioterapia no solamente afecta a las células irradiadas, sino que también afecta a las células vecinas, fenómeno conocido como efecto de vecindad, provocando en estas células daño en el DNA y muerte celular. Este efecto se produce a través de las uniones en hendidura (gap) entre las células y por mecanismos mediados por señales del sistema inmunológico, principalmente citoquinas y quimiocinas.⁹²⁻⁹⁴

Este efecto se ha objetivado con dosis de radiación de hasta 10 Gy, lo que sugirió que también podría producirse con la administración de la RIO.¹⁷⁵ Hu et al.¹⁷⁶ mostraron que la irradiación con bajas dosis de fibroblastos de la piel provocaba daño en el DNA en las células no irradiadas mediado por un efecto de vecindad.

Por otra parte, este efecto de vecindad, además de manifestarse por un daño directo en el DNA, puede producir factores secretados por las células que causen ese daño de una manera indirecta. Chen et al.¹⁷⁷ objetivaron este efecto de vecindad mediado por factores secretados que causaban un aumento de especies reactantes de oxígeno en las células no irradiadas vecinas.

Estudios posteriores han objetivado este mismo efecto con la RIO, mediado de una forma indirecta por las citoquinas presentes en los débitos de drenajes quirúrgicos que difieren significativamente entre pacientes a las que solo se les ha realizado cirugía conservadora del cáncer de mama y aquellas a las que se les ha asociado RIO.⁹³

Piotrowski et al.⁹² han publicado recientemente sus resultados. Este grupo incubó dos líneas celulares de cáncer de mama diferentes (MCF-7 y MDA-MB-468) con fluido de drenaje del lecho quirúrgico de pacientes a las que se les había realizado cirugía conservadora de cáncer de mama solamente o asociada a RIO, así como con un medio acondicionado de células irradiadas solo o asociado a fluido del drenaje de las pacientes a las que solo se les había realizado cirugía. En estos cuatro medios estudiaron el daño producido en el DNA y observaron que éste era mediado por un efecto de vecindad que se objetivaba tras la administración de la RIO.

Además, Kulcenty et al.⁹³ mostraron que el efecto que la cirugía tiene en la adquisición de un fenotipo más agresivo en las células tumorales del cáncer de mama relacionado con la transición epitelio-mesenquimal, se revierte tras la administración de la RIO mediado por el efecto de vecindad a través de las citoquinas. En esta línea de investigación, en un estudio posterior publicado por el mismo grupo confirman estos hallazgos mediante un análisis completo del transcriptoma celular.⁹⁴ Así mismo, Zaleska et al.⁹⁰ demostraron que el fluido postoperatorio de las pacientes tratadas con RIO presentaba una disminución en las células CD44⁺/CD24^{low}, más agresivas.

Sin embargo, aunque los cambios objetivados tras la RIO en el cáncer de mama parecen inhibir el crecimiento tumoral, algunos autores indican que los mediadores del efecto de vecindad también podrían conllevar el desarrollo del tumor.⁹⁰ Tsai et al.¹⁷⁸ objetivaron que fibroblastos irradiados en el cáncer de mama

secretaban metaloproteinasas que degradaban la matriz extracelular y promovían la invasión.

Por otro lado, estos efectos descritos no parecen verse influidos por el tipo de energía utilizado durante la administración de la RIO, ya que el grupo de Belletti et al.⁸⁸ utilizó fotones como fuente de energía y el grupo de Kulcenty et al.⁹³, electrones, con resultados equiparables.

1.7.2.2 Efectos en el estroma: fibrosis

La RIO, al igual que la radioterapia estándar, puede promover la aparición de fibrosis posteriormente en las pacientes a las que se les somete a esta técnica. Veronesi et al.¹⁷⁹ encontraron que un 6% de sus pacientes presentaron complicaciones tras la aplicación de la RIO, de las cuales, las más frecuentes fueron la fibrosis y la necrosis grasa.

Sin embargo, en un estudio desarrollado por Key et al.¹⁸⁰ se objetivó que después de la RIO solamente presentó fibrosis grado II o superior un 2.4%, mientras que si se asociaba con radioterapia externa, esta cifra se elevaba al 43.3%. Según la bibliografía publicada, las complicaciones más severas se han asociado a dosis superiores de 24 Gy, situándose en torno a una incidencia del 30%, que desciende al 25% con dosis de 20-21Gy.^{95, 179, 181-183}

En los últimos años asistimos a un desarrollo en las técnicas utilizadas en el tratamiento del cáncer de mama, apareciendo nuevas terapias como la RIO asociada a la cirugía conservadora.^{84, 184} La mayoría de los estudios coinciden en que la complicación más frecuente tras este tratamiento es la fibrosis, por lo que se hace mandatorio identificar marcadores que nos ayuden a predecirla.^{1, 95, 185}

Estudios previos han relacionado el TGF- β con el desarrollo de fibrosis tras el tratamiento del cáncer de mama, por lo que podría servir como un marcador temprano de desarrollo de estas complicaciones.^{155, 162, 186}

Algunos autores han investigado la alteración de los valores de TGF- β tras la radioterapia encontrados en el débito del drenaje. Scherer et al.¹⁸⁶ recogieron los débitos de drenaje durante 24 horas de pacientes a las que les habían aplicado RIO o no respectivamente, y objetivaron que la RIO no tenía un efecto significativo en

los niveles de TGF- β en el drenaje. Sin embargo, los valores que encontraron eran superiores a aquellos que se relacionan con fibrosis y demostraron así mismo que el TGF- β hallado era activo en el débito de drenaje.

Se hace por tanto necesario conocer el efecto que la aplicación de la RIO tiene sobre este factor determinante, ya que la inhibición de la actividad del mismo en pacientes seleccionadas con valores elevados podría reducir el riesgo de fibrosis.

Por lo tanto, estas pacientes podrían ser elegidas para tratamientos que pretendan contrarrestar el efecto profibrótico que tiene esta citoquina para evitar los efectos adversos sin comprometer el control tumoral. Numerosas estrategias se encuentran en estudio, utilizándose principalmente las siguientes: oligonucleótidos antisentido (ASOs) que reducen la expresión de TGF- β , anticuerpos neutralizantes que impiden la interacción con el receptor ligando de TGF- β , proteínas recombinantes quiméricas para secuestrar la TGF- β y moléculas inhibitoras de los receptores quinasa de TGF- β .¹⁸⁶⁻¹⁸⁸

2. Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La cirugía conservadora asociada a radioterapia constituye el tratamiento de elección en las pacientes con cáncer de mama.

La radioterapia externa es el tratamiento estándar, siendo un componente fundamental en el tratamiento del cáncer de mama que afecta tanto al control local como a la supervivencia.¹

A pesar de la mejora que han supuesto, principalmente, el avance en las técnicas de radioterapia, así como el conocimiento de la radiobiología tumoral, que nos ha permitido implantar técnicas de irradiación parcial acelerada como la RIO, el efecto que tanto la cirugía como la radioterapia tienen en el microambiente tumoral continúa siendo hoy en día objeto de estudio.⁸⁸

La RIO, administrada en el mismo acto operatorio en el lecho quirúrgico, lugar donde ocurre la mayoría de la recurrencias, podría, además de esterilizar el lecho tumoral de células cancerígenas, tener un efecto compensador del factor favorecedor para el desarrollo del tumor que constituye la propia cirugía, a través de la alteración del microambiente tumoral y la inducción de mecanismos de respuesta del sistema inmunológico.^{73, 89, 90, 92, 140, 141, 163-165}

La RIO es la primera técnica de radioterapia que nos permite estudiar el efecto de la misma en el microambiente tumoral en el momento de la cirugía en humanos in vivo.⁸⁸

El conocimiento de los efectos que los nuevos tratamientos ocasionan en la cinética de crecimiento de las células tumorales abriría una nueva etapa en el desarrollo de tratamientos perioperatorios dirigidos a dianas concretas que compensen las consecuencias dañinas de la cirugía y nos ayuden a comprender los mecanismos de desarrollo del tumor.

2.2 HIPÓTESIS DE TRABAJO

La RIO tras cirugía conservadora de cáncer de mama podría, además de esterilizar de células cancerígenas el lecho tumoral, alterar el microambiente del mismo, compensando el efecto de la agresión quirúrgica y favoreciendo los mecanismos de respuesta frente al tumor a través del sistema inmunológico.

2.3 OBJETIVO DEL ESTUDIO

2.3.1 Objetivo principal

Determinar la expresión en suero y drenaje quirúrgico de proteínas involucradas en la cinética de crecimiento de las células tumorales de cáncer de mama (IL1 β , IL6, IL8, CXCL10, TGF- β , TNF- α) en pacientes a las que se les ha realizado cirugía conservadora asociada a RIO en comparación con aquellas que recibirán radioterapia externa según terapia convencional en lugar de RIO.

2.3.1 Objetivo secundario

Valorar si valores elevados de TGF- β en suero y drenaje quirúrgico después de la cirugía conservadora asociada a RIO en pacientes con cáncer de mama podría servir como marcador temprano del desarrollo de fibrosis.

3. Material y métodos

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Con el objetivo de resolver los interrogantes planteados en la hipótesis, se planteó la realización de un estudio prospectivo multicéntrico dividido en dos grupos comparativos con casos consecutivos de las pacientes a las que se les ha sometido a una cirugía conservadora por cáncer de mama asociada o no a RIO.

Para evaluar la relación de la RIO con los valores de las proteínas IL1 β , IL6, IL8, CXCL10, TGF- β y TNF- α objetivados en las muestras de drenaje quirúrgico y suero de las pacientes se han recogido en todos los casos muestras de suero preoperatorio y a las 24 horas desde la cirugía y muestras de drenaje quirúrgico a las 6 y 24 horas desde la cirugía.

El estudio ha estado centralizado en el laboratorio del Servicio de Bioquímica Clínica del Hospital Universitario Miguel Servet con las muestras recogidas por el Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo en el Hospital Universitario Miguel Servet, Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa y Hospital de Barbastro.

3.2 MUESTRA

3.2.1 Población objeto de estudio

Se consideró *población diana o de referencia* a la constituida por aquellas pacientes remitidas a la Unidad de Mama del Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo del Hospital Universitario Miguel Servet, Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa y Hospital de Barbastro por cáncer de mama.

La *población accesible* se conformó con todas aquellas pacientes del área de salud de dichos hospitales y que poseen cobertura de la Seguridad Social.

3.2.2 **Criterios de inclusión**

3.2.2.1 **Grupo de casos**

Los criterios de inclusión en el grupo correspondiente a las pacientes a las que se les ha administrado la RIO asociada a la cirugía conservadora por cáncer de mama, grupo de casos, responden a los criterios de selección de la RIO en la Unidad de Mama del Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo del Hospital Universitario Miguel Servet.

RIO CRITERIOS DE SELECCIÓN HOSPITAL MIGUEL SERVET	
Edad	> 50 años
Etapa del climaterio	Postmenopausia
Estudio genético	BRCA 1 y BRCA 2 negativo
Tamaño tumoral	< 3cm (T1,T2)
Estudio de extensión	Sin afectación ganglionar o distante
Estudio de márgenes intraoperatorios de la pieza	Negativos (\geq 2mm)
Pruebas de imagen	Unicéntrico y unifocal
Invasión linfovascular	Negativa
Receptores hormonales	Positivos
Tipo anatomopatológico	Ductal, mucinoso, tubular, coloide
Carcinoma intraductal extenso	Ausente

Tabla 11: Criterios de selección RIO. *Elaboración propia*

3.2.2.2 **Grupo de controles**

El grupo de controles son las pacientes con cáncer de mama a las que se les ha realizado cirugía conservadora sin aplicación de la RIO con los mismos criterios de inclusión que el grupo de casos en la Unidad de Mama del Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo del Hospital Universitario Miguel Servet, Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa y Hospital de Barbastro.

Las pacientes incluidas en el grupo de controles pertenecientes a la Unidad de Mama del Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo del Hospital Universitario Miguel Servet no recibieron RIO por presentar una mama pequeña para la aplicación de la técnica.

Por su parte, las pacientes incluidas en el grupo de controles pertenecientes a las Unidades de Mama de los Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa y del Hospital de Barbastro no recibieron RIO por no disponer de dicha técnica en los mencionados centros.

3.2.3 Criterios de exclusión

Los criterios de exclusión para la RIO son los siguientes:

RIO CRITERIOS DE EXCLUSIÓN HOSPITAL MIGUEL SERVET	
Embarazo	
Antecedentes	Radioterapia o neoadyuvancia
Etapa del climaterio	Premenopausia
Estudio genético	BRCA positivo
Tamaño tumoral	> 3cm (T3, T4)
Estudio de extensión	Ganglios positivos
Pruebas de imagen	Multifocal o multicéntrico
Invasión linfovascular	Positiva
Tipo anatomopatológico	C. Lobulillar infiltrante
Estudio inmunohistoquímico	Receptores hormonales negativos, HER2positivo
Carcinoma intraductal extenso	Presente

Tabla 12: Criterios de exclusión RIO. *Elaboración propia*

Se ha excluido de este estudio a las pacientes con enfermedades sistémicas benignas con conocida alteración en las vías moleculares de las proteínas a estudio como por ejemplo un caso de enfermedad de Wernicke-Korsakoff, así como a las pacientes con tumor primario múltiple.

3.2.4 Cumplimiento de normas éticas

Todas las pacientes incluidas en el estudio han firmado el consentimiento informado específico requerido (Anexo II y III). El estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética de la Investigación de la Comunidad de Aragón (Anexo IV).

3.3 PROCEDIMIENTOS

3.3.1 Formularios

Se completó un formulario para cada paciente incluida en el estudio con los parámetros para cumplir los objetivos del proyecto de investigación que se encuentran reunidos bajo los siguientes apartados fundamentales:

1. Datos demográficos y clínicos de la paciente:
 - Edad
 - Sexo
 - Antecedentes patológicos
 - Etapa del climaterio: postmenopausia o premenopausia
 - Estudio genético: BRCA negativo o positivo

2. Datos diagnósticos del cáncer de mama:
 - Motivo de consulta
 - Tamaño tumoral
 - Localización tumoral: lateralidad y cuadrante mamario
 - Estudio ganglionar
 - Estudio de extensión
 - Centricidad y focalidad

3. Datos quirúrgicos:
 - Tipo de cirugía: cirugía conservadora
 - Estudio de márgenes libres de la pieza(mm)
 - Estudio ganglionar: BSGC

4. Datos anatomopatológicos:
 - Tipo anatomopatológico
 - TNM
 - Invasión linfovascular
 - Presencia de carcinoma intraductal extenso

5. Datos moleculares e inmunohistoquímicos:
 - Receptores hormonales
 - HER2

3.3.2 Tratamiento de radioterapia

La RIO se ha aplicado mediante una fuente radiactiva Xofigo Axxent™ x-Ray Source modelo S700 que trabaja con tensión de 50 KV, proporciona isodosis esféricas e imparte 20Gy en la superficie del aplicador tipo balloon. Para el cálculo de dosis, el fabricante proporciona todos los valores de caracterización de la fuente de rayos X necesarios para modelar el Sistema de Planificación, en nuestro caso, BrachyVision™ de Varian. El espesor de tejido entre el balloon y la piel ha sido siempre superior a 1cm comprobado mediante ecografía intraoperatoria.¹

3.3.3 Inmunodetección de proteínas

Las muestras de suero y de drenaje quirúrgico son centrifugadas, esterilizadas y almacenadas a -80°C en el momento de recogida de las mismas para conservarlas intactas.

Posteriormente, se ha realizado en cada una de las muestras recogidas el análisis de IL1 β , IL6, IL8, CXCL10, TGF- β , TNF- α mediante ELISA kits específico para proteínas humanas (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) usando controles positivos y negativos según las instrucciones de la casa comercial. Todas las determinaciones se han realizado por duplicado para considerarse específicas.

3.3.4 Valoración de fibrosis

Las pacientes en las que se objetivó valores elevados de TGF- β en las muestras, fueron invitadas a realizar una valoración clínica del grado de fibrosis tras 24 meses desde la cirugía conservadora del cáncer de mama asociada a RIO.

La valoración se realizó según la escala SOMA/LENT (Subjective, Objective Management, Analytic, Late Effect of Normal Tissue) que se expone a continuación:

Fibrosis / Necrosis grasa	Grado
Inexistente	0
Incremento de la densidad poco palpable	1
Incremento de la densidad definido y solidez	2
Densidad muy marcada / Retracción	3

Tabla 13: Escala SOMA/LENT. Tabla adaptada de *LENT SOMA scales for all anatomic sites. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1995; 31: 1049-91.*

3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

3.4.1 Cálculo de tamaño muestral

El cálculo del tamaño de muestra se basa en el cálculo para comparación de medias, de dos grupos independientes, asumiendo que la variable correspondiente a las proteínas analizadas (IL1 β , IL6, IL8, CXCL10, TGF- β , TNF- α) sigue una distribución normal y usando la prueba t de Student.

Suponemos que la varianza de dicha variable es similar en ambos grupos pero desconocida. Para cuantificar la magnitud de la diferencia entre los grupos hemos utilizado la denominada diferencia estandarizada (g) de medias utilizada por Machín et al.¹⁸⁹ siguiendo las recomendaciones de Cohen¹⁹⁰ y asumiendo que el efecto es grande con $g=0,8$.

A un nivel de confianza del 95% y una potencia mínima del 80% son necesarias 25 pacientes por grupo. Suponiendo un 5 % de posibles pérdidas, la muestra necesaria estimada es de 27 pacientes por grupo.

3.4.2 Análisis de los resultados

Se realizó en primer lugar un análisis descriptivo de las variables a estudio. Las variables cualitativas se describieron mediante frecuencias absolutas y relativas. Se evaluaron criterios de normalidad de las variables cuantitativas mediante el test de Shapiro-Wilk. Las variables paramétricas se describieron con media y desviación estándar, y las variables no paramétricas, por su parte, se describieron con mediana, primer cuartil y tercer cuartil.

Posteriormente se realizó un análisis bivalente. Se estudió la asociación estadística entre variables cualitativas mediante la prueba de Chi-Cuadrado y se utilizó el test de Fisher en caso de no cumplirse los criterios de aplicabilidad. Se evaluaron las diferencias en la distribución de las variables cuantitativas estudiadas según el tratamiento asignado utilizando el test de T de Student en el caso de variables normales, o la prueba de U de Mann Whitney en el caso de variables no paramétricas.

También se calcularon las OR entre casos y controles, en los casos que procedía y que era posible por las características de la tabla.

Se valoraron diferencias en las proteínas analizadas entre casos y controles, así como en el tiempo en el que se toma la muestra (preoperatorio, a las 6 horas y 24 horas desde la cirugía), y el tipo de muestra (sangre y drenaje quirúrgico), a través de modelos de medidas repetidas para datos no paramétricos (nparLD: An R Software Package for the Nonparametric Analysis of Longitudinal Data in Factorial Experiments).

Para toda la investigación se utilizó el software estadístico R 3.5.1. Se estableció el nivel de significación estadística para un p valor menor de 0.05.

4. Resultados

4. **RESULTADOS**

Se reclutaron un total de 60 pacientes para el estudio, procedentes del Hospital Universitario Miguel Servet (n.32), el Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa (n.16) y el Hospital de Barbastro (n.12).

Todas las pacientes incluidas cumplían los criterios de inclusión sin observar diferencia estadística entre los grupos.

Del total de la muestra, el 50% de las pacientes (n. 30) conformaron el grupo de casos, recibiendo la RIO tras la cirugía conservadora del cáncer de mama. El 50% restante (n.30), formaron el grupo de controles realizándose cirugía conservadora del cáncer de mama asociada a radioterapia convencional.

4.1 **DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA CASUÍSTICA**

4.1.1 **Características demográficas y clínicas**

La edad media de las pacientes fue de 65.53 años (DT 9.44). En el caso de los controles fue de 66.47 años (DT 7.49), mientras que en los casos fue ligeramente menor, de 64.60 años (DT 11.10), sin que se observen diferencias estadísticas significativas (tabla 15).

	[TOTAL] N=60	CONTROL N=30	CASO N=30	p valor**
Edad*	65.53 (9.44)	66.47 (7.49)	64.60 (11.10)	0.4487
<i>*Media (Desviación Típica)** t de Student</i>				

Tabla 14: Edad. *Elaboración propia*

Todas las pacientes eran mujeres sin antecedentes de radioterapia o tratamiento neoadyuvante y sin comorbilidades excluyentes. Además, todas ellas se encontraban en etapa postmenopáusica y no eran portadoras de mutaciones en el gen BRCA.

4.1.2 Características diagnósticas del cáncer de mama

4.1.2.1 Motivo de consulta

Las 30 pacientes del grupo de controles acudieron a la consulta por nódulo mamario palpable, mientras que en el grupo de los casos hubo 4 pacientes (13.33%) que acudieron a causa del resultado de una mamografía de screening patológica. Se observa que no hay relación estadística significativa (p valor = 0.1124) (tabla 16).

	[TOTAL] N=60	CONTROL N=30	CASO N=30	p valor
Motivo de Consulta:				0.1124
NODULO	56 (93.33%)	30 (100.00%)	26 (86.67%)	
MAMOGRAFÍA	4 (6.67%)	0 (0.00%)	4 (13.33%)	
<i>* Test Chi-cuadrado o Fisher según corresponda</i>				

Tabla 15: Motivo de consulta. *Elaboración propia*

4.1.2.2 Tamaño tumoral

En cuanto al tamaño tumoral analizado en milímetros (mm), la media fue de 14.89 mm (DT 5.74). En el grupo de controles la media fue de 15 mm (DT 5.55) y en el grupo de los casos fue ligeramente inferior, 14.78 milímetros (DT 6.01), sin que se observen diferencias estadísticamente significativas (tabla 17).

	[TOTAL] N=60	CONTROL N=30	CASO N=30	p valor
Tamaño (mm)*	14.89 (5.74)	15.00 (5.55)	14.78 (6.01)	0.8851**
<i>*Se aporta Media (Desviación Típica) ** T de Student</i>				

Tabla 16: Tamaño tumoral. *Elaboración propia*

Resultados

4.1.2.3 Localización tumoral

En el grupo de controles, 13 pacientes (43.33%) presentaron el tumor en la mama derecha y 17 pacientes (56.66%) en la izquierda. En el grupo de casos, la lateralidad tumoral se dividió en 12 pacientes (40%) con el cáncer de mama en la mama derecha y 18 (60%) pacientes en la izquierda (Figura 25).

La distribución de frecuencias de la localización tumoral tanto en los casos como en los controles en ambas mamas fue variada, destacando la localización del tumor en los cuadrantes superiores (Figuras 26, 27).

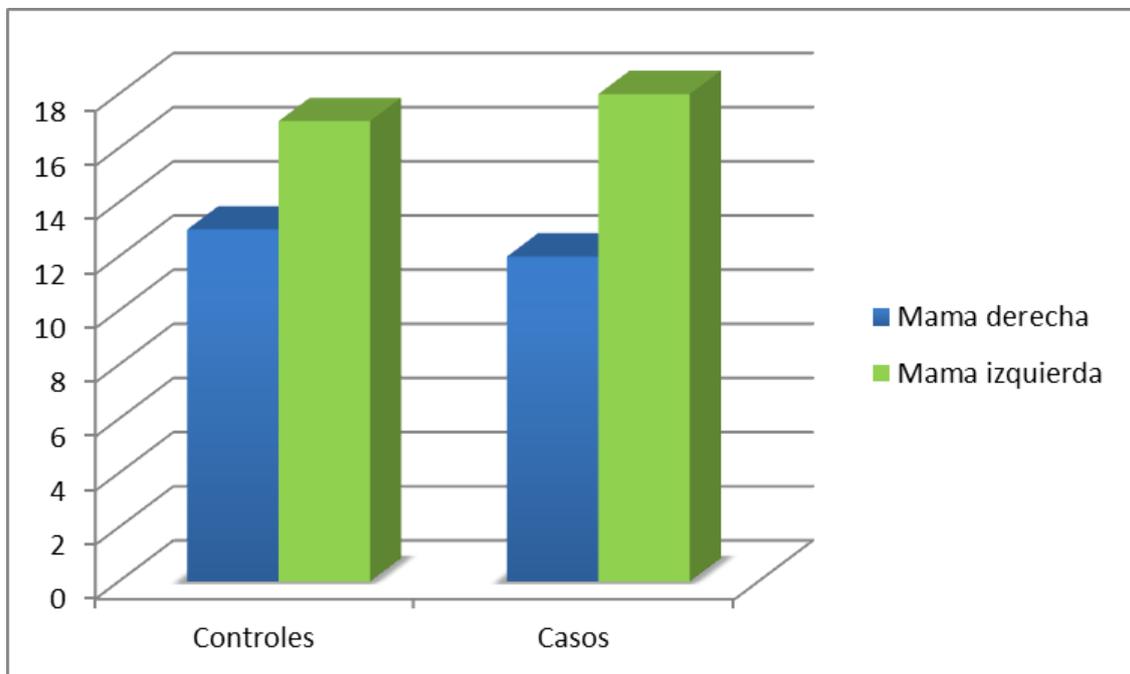


Figura 26: Lateralidad tumoral. *Elaboración propia*

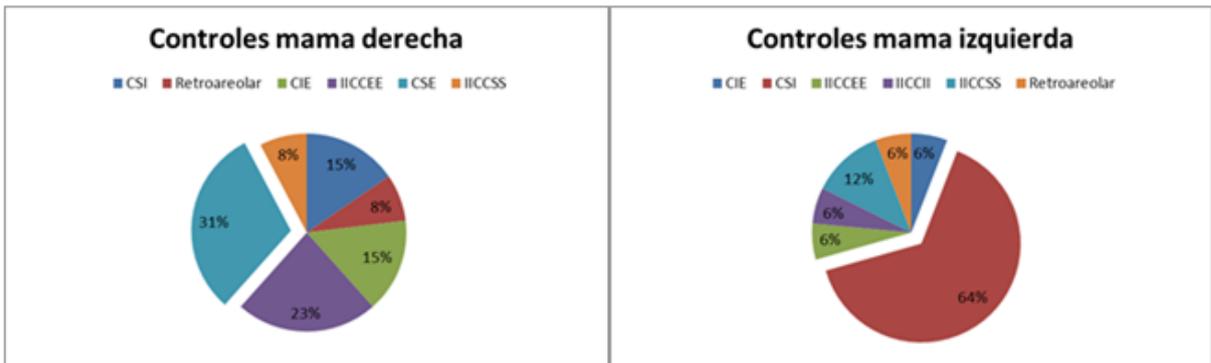


Figura 27: Localización tumoral controles. *Elaboración propia*

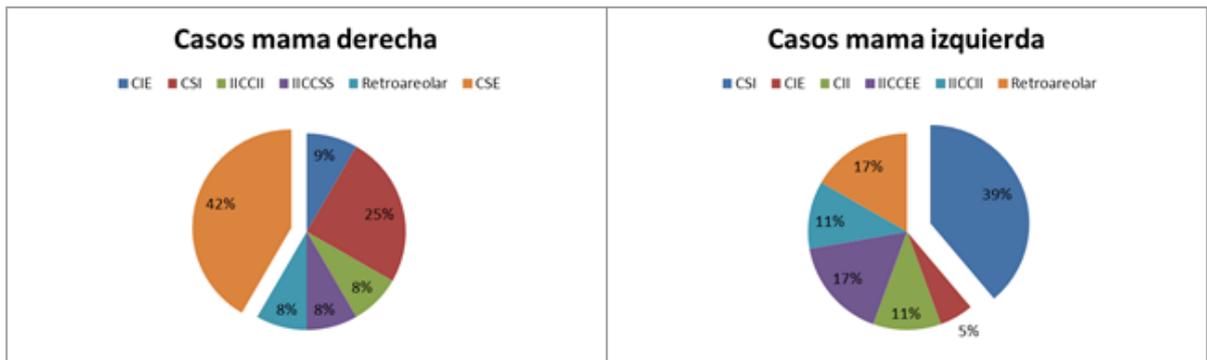


Figura 28: Localización tumoral casos. *Elaboración propia*

Resultados

4.1.2.4 Estudio ganglionar

A todas las pacientes se les realizó preoperatoriamente evaluación ganglionar mediante examen clínico y ecográfico, así como anatomopatológico mediante PAAF en aquellos casos con sospecha radiológica. Dicha evaluación resultó negativa en toda la muestra (100%).

4.1.2.5 Estudio de extensión

En todos los casos se llevó a cabo un estudio de extensión previo a la cirugía, según el protocolo de la Unidad de Mama del Hospital Universitario Miguel Servet, mediante radiografía de tórax, ecografía abdomino-pélvica, analítica sanguínea que incluye bioquímica con marcadores tumorales(CA 15.3 y CEA) y enzimas hepáticas con especial interés en la fosfatasa alcalina como indicador de posible afectación metastásica ósea, así como rastreo óseo en tumores T2.

El estudio de extensión resultó negativo en las 60 pacientes (100%).

4.1.2.6 Centricidad y focalidad

La caracterización del tumor en unicéntrico (aquel en el que no se detectan nódulos en distinto cuadrante) y unifocal (aquel en el que no se detectan nódulos en el mismo cuadrante) como criterio de inclusión en el estudio al ser requisito para indicación de la utilización de la RIO se cumplió en todas las pacientes (100%).

Cabe destacar que, aunque preoperatoriamente el 100% de la muestra se catalogó como cáncer de mama unicéntrico y unifocal, en el estudio anatomopatológico posterior de la pieza se objetivó un caso de tumor bifocal con nódulo en margen posterior y un control con tumor multifocal, sin que se observaran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos por este motivo(tabla 18).

	[TOTAL] N=60	CONTROL N=30	CASO N=30	p valor
Unicéntrico Unifocal:				1.0000*
BIFOCAL (margen posterior)	1 (1.67%)	0 (0.00%)	1 (3.33%)	
MULTIFOCAL	1 (1.67%)	1 (3.33%)	0 (0.00%)	
SI	58 (96.67%)	29 (96.67%)	29 (96.67%)	

**Test Chi-cuadrado o Fisher según corresponda*

Tabla 17: Centricidad y focalidad. *Elaboración propia*

4.1.3 Características de la intervención quirúrgica

4.1.3.1 Tipo de cirugía

En las 30 pacientes (100%) asignadas al grupo de casos se realizó como se tenía previsto cirugía conservadora del cáncer de mama asociada a RIO, y en las 30 pacientes (100%) del grupo de controles se realizó cirugía conservadora. En todos los casos se asoció estudio ganglionar en el mismo acto quirúrgico con BSGC.

4.1.3.2 Márgenes de resección

El estudio de márgenes libres de la pieza se consideró negativo cuando era mayor de 2mm, realizándose estudio intraoperatorio y ampliación de márgenes de resección en caso necesario. Los márgenes de resección fueron negativos en todos los casos (100%).

Resultados

4.1.3.3 Biopsia selectiva de ganglio centinela (BSGC)

El estudio ganglionar realizado mediante BSGC resultó finalmente negativo en 41 pacientes (68.33%), 21 pacientes pertenecientes al grupo de controles, lo que representa un 70% del grupo, y 20 pacientes pertenecientes al grupo de casos, un 66.67% del grupo.

Cabe destacar que en el grupo de controles hubo 7 pacientes (23.33%) en las que se objetivaron micrometástasis y 2 pacientes (6.67%) con macrometástasis. Solo en un caso de macrometástasis se realizó, previa decisión del comité de tumores, linfadenectomía axilar diferida con estudio anatomopatológico del resto de los ganglios axilares sin hallazgos patológicos.

Por su parte, en el grupo de casos hubo 1 paciente (3.33%) con células aisladas en el estudio ganglionar, 4 pacientes (13.33%) con micrometástasis y 5 pacientes (16.67%) con macrometástasis. La decisión del comité de tumores fue realizar linfadenectomía axilar diferida en 2 casos. Uno de ellos de entre los catalogados como micrometástasis ya que se objetivó un ganglio no centinela afectado, resultando el estudio anatomopatológico del resto de los ganglios axilares positivo en 2 ganglios y otro caso con macrometástasis, resultando el estudio anatomopatológico posterior positivo para macrometástasis en 4 ganglios linfáticos axilares.

No se objetivó diferencia estadística significativa entre los grupos (p valor 0.3671) (tabla 19).

	[TOTAL] N=60	CONTROL N=30	CASO N=30	p valor
BSGC:				0.3671
Células aisladas	1 (1.67%)	0 (0.00%)	1 (3.33%)	
Micrometástasis	11 (18.33%)	7 (23.33%)	4 (13.33%)	
Macrometástasis	7 (11.67%)	2 (6.67%)	5 (16.67%)	
Negativo	41 (68.33%)	21 (70.00%)	20 (66.67%)	

Tabla 18: Biopsia selectiva de ganglio centinela. *Elaboración propia*

4.1.4 Características del estudio anatomopatológico

4.1.4.1 Tipo anatomopatológico

En todos los casos (100%) el estudio del tipo anatomopatológico del cáncer de mama resultó concordante con los tipos establecidos como criterios de inclusión del estudio (ductal, mucinoso, tubular, coloide), sobresaliendo entre todos ellos el de tipo ductal (93.33%).

Resultados

4.1.4.2 Clasificación TNM

En cuanto a la clasificación TNM del cáncer de mama de las pacientes del estudio no se observan diferencias significativas entre casos y controles (p valor 1.0000).

Sólo hay una paciente perteneciente al grupo de casos con estudio anatomopatológico ganglionar posterior a linfadenectomía axilar catalogado como N2 (tabla 20) (figuras 28, 29).

	[TOTAL] N=60	CONTROL N=30	CASO N=30	p valor*
TNM:				1.0000
>N1a	1 (1.67%)	0 (0.00%)	1 (3.33%)	
T1-2, ≤N1a	59 (98.33%)	30 (100.00%)	29 (96.67%)	

* Test Chi-cuadrado o Fisher según corresponda

Tabla 19: Clasificación TNM. *Elaboración propia*

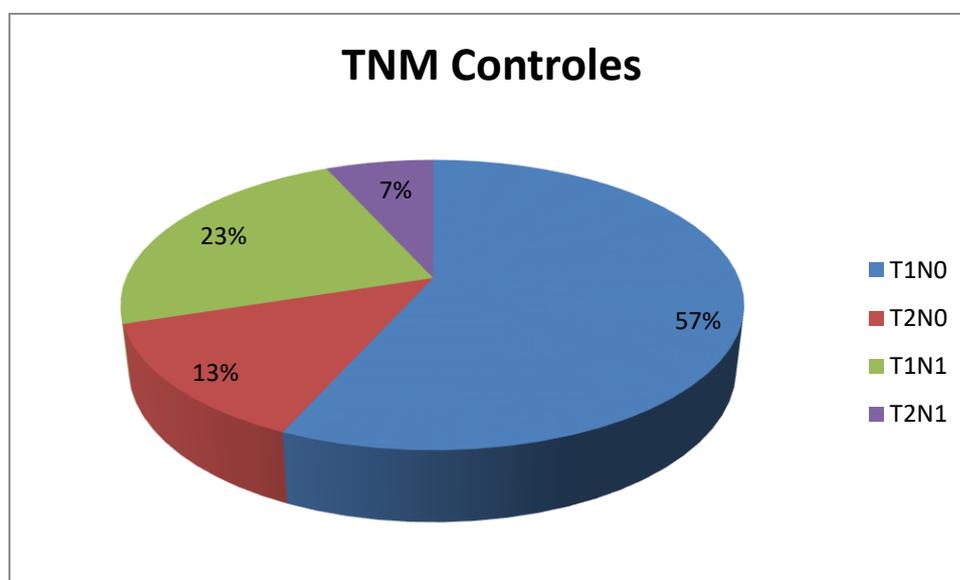


Figura 29: Clasificación TNM Controles. *Elaboración propia*

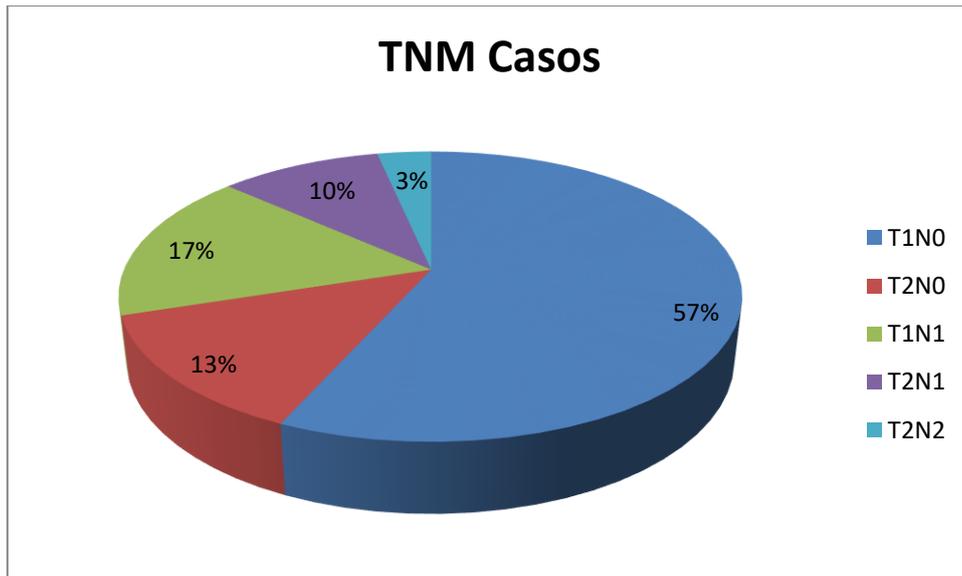


Figura 30: Clasificación TNM Casos. *Elaboración propia*

La clasificación por estadios de las pacientes de la muestra queda distribuida de la siguiente manera (figura 30):

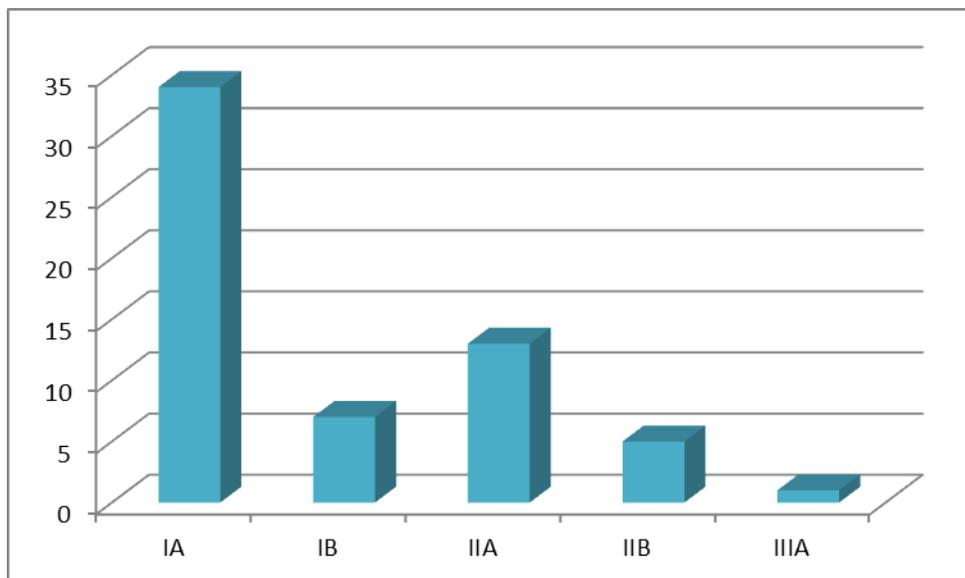


Figura 31: Estadio. *Elaboración propia*

Resultados

4.1.4.3 Invasión linfovascular

En 9 pacientes se objetivó invasión linfovascular (16.07%) en el estudio anatomopatológico definitivo, 5 pertenecientes al grupo de controles (16.67%) y 4 al grupo de casos (15.38%), no observándose diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (tabla 21).

	[TOTAL] N=60	CONTROL N=30	CASO N=30	p valor*
Invasión linfovascular:				1.0000
NEGATIVA	47 (83.93%)	25 (83.33%)	22 (84.62%)	
POSITIVA	9 (16.07%)	5 (16.67%)	4 (15.38%)	
<i>* Test Chi-cuadrado o Fisher según corresponda</i>				

Tabla 20: Invasión linfovascular. *Elaboración propia*

4.1.4.4 Carcinoma intraductal

La presencia de carcinoma intraductal extenso no se objetivó en ninguna de las pacientes de la muestra (100%).

4.1.5 Características moleculares e inmunohistoquímicas

4.1.5.1 Receptores hormonales

Los receptores hormonales de estrógeno y progesterona evaluados fueron positivos en todas las pacientes de la muestra (100%).

4.1.5.2 HER2

En el estudio de HER2 se objetivó que en el grupo de controles, 28 pacientes (93.33%), obtuvieron un resultado inicial negativo mientras que en el grupo de casos, este porcentaje fue significativamente inferior, 19 pacientes (63.33%) (p valor 0.0122) (tabla 22). Sin embargo, al analizar los resultados no valorables con la técnica de hibridación fluorescente *in situ* (FISH), en todos los casos fue negativo, por lo que no se observan diferencias entre el grupo de casos y controles.

	[TOTAL] N=60	CONTROL N=30	CASO N=30	p valor
HER2:				0.0122
NEGATIVO	47 (78.33%)	28 (93.33%)	19 (63.33%)	
NO VALORABLE	13 (21.67%)	2 (6.67%)	11 (36.67%)	

Tabla 21:HER2. *Elaboración propia*

4.1.6 Inmunodetección de proteínas

Para evaluar la relación de la RIO con los valores de las proteínas IL1 β , IL6, IL8, CXCL10, TGF- β , TNF- α se recogieron muestras de suero preoperatorio y a las 24 horas desde la cirugía en todos los casos (n.60) como se tenía previsto.

Sin embargo, la recogida de las muestras de drenaje quirúrgico a las 6 y 24 horas desde la cirugía no se pudo completar en todos los casos por no disponer de suficiente muestra.

En relación a la muestra de drenaje quirúrgico a las 6 horas desde la cirugía se obtuvieron datos de 47 pacientes (78.33%), 18 de ellas pertenecientes al grupo de controles (60%) y 29 al grupo de casos (96.67%).

Por su parte, la muestra de drenaje quirúrgico a las 24 horas desde la cirugía pudo recogerse en 48 pacientes (80%), 19 pacientes pertenecientes al grupo de controles (63.33%) y 29 al de casos (96.67%).

El porcentaje de pacientes pertenecientes al grupo de casos a los que se les pudo recoger muestra de drenaje quirúrgico es superior al porcentaje de pacientes pertenecientes al grupo de control tanto a las 6 como a las 24 horas desde la cirugía (tabla 23).

	[TOTAL] N=60	CONTROL N=30	CASO N=30
Suero preoperatorio	60 (100.00%)	30 (100.00%)	30 (100.00%)
Drenaje 6 horas	47 (78.33%)	18 (60.00%)	29 (96.67%)
Suero 24 horas	60 (100.00%)	30 (100.00%)	30 (100.00%)
Drenaje 24 horas	48 (80.00%)	19 (63.33%)	29 (96.67%)

Tabla 22: Muestra. *Elaboración propia*

4.2 ANÁLISIS BIVARIANTE

En primer lugar, se realizó un análisis bivalente comparando los valores de IL1 β , IL6, IL8, CXCL10, TGF- β y TNF- α objetivados en los diferentes tipos de muestra entre las pacientes a las que se les ha realizado cirugía conservadora de cáncer de mama recibiendo posteriormente la RIO (casos) o no (controles).

En aquellos que el p valor sea menor de 0.05 podremos decir que hay diferencias significativas (tabla 24).

Nuestros resultados muestran diferencias estadísticamente significativas entre las pacientes pertenecientes al grupo de casos y aquellas pertenecientes al grupo de controles en todos los casos salvo para los valores obtenidos en las muestras de suero preoperatorio y suero a las 24 horas desde la cirugía de CXCL10, suero preoperatorio de TNF- α , drenaje a las 6 horas desde la cirugía de IL6, IL1 β , TNF- α y TGF- β , así como drenaje a las 24 horas desde la cirugía de IL1 β .

Resultados

Tipo de muestra	[ALL]*	CASO*	CONTROL*	p valor**
IL6 suero preoperatorio	24.10 [19.15;33.45]	20.70 [15.70;34.50]	25.60 [23.20;33.30]	0.014
IL6 suero 24 horas	27.35 [22.88;45.00]	22.70 [16.10;26.90]	39.10 [27.80;47.20]	<0.001
IL6 drenaje 6 horas	62740.00 [20080.00;133750.00]	66310.00 [26560.00;186600.00]	39905.00 [16442.50;91357.25]	0.110
IL6 drenaje 24 horas	82990.00 [36460.00;131150.00]	50630.00 [27120.00;92940.00]	130600.00 [73030.00;154877.50]	0.006
CXCL10 suero preoperatorio	94.55 [55.20;372.25]	69.80 [62.83;137.00]	126.00 [40.98;443.50]	0.569
CXCL10 suero 24 horas	68.45 [29.80;207.50]	72.25 [53.73;315.50]	46.75 [22.45;137.50]	0.050
CXCL10 drenaje 6 horas	2183.00 [1007.50;5453.50]	1045.00 [712.00;1395.00]	6037.00 [4172.50;6841.50]	<0.001
CXCL10 drenaje 24 horas	1296.50 [632.50;5590.75]	708.00 [335.00;1255.00]	5975.00 [3054.50;7744.00]	<0.001
IL8 suero preoperatorio	4.00 [1.80;7.90]	2.00 [1.70;6.80]	4.40 [2.30;8.10]	0.016
IL8 suero 24 horas	2.55 [1.90;7.98]	1.90 [1.75;7.35]	3.50 [2.50;8.20]	0.006
IL8 drenaje 6 horas	425.75 [405.35;436.15]	414.85 [338.20;422.20]	438.45 [433.83;451.88]	<0.001
IL8 drenaje 24 horas	425.50 [366.85;446.35]	400.20 [294.12;421.20]	453.10 [445.75;475.30]	<0.001

*Mediana (1er Cuartíl;3er Cuartíl)** U de Mann Withney

Tabla 23: Análisis bivariante. *Elaboración propia*

Tipo de muestra	[ALL]*	CASO*	CONTROL*	p valor**
IL1β suero preoperatorio	1.90 [1.70;2.00]	1.70 [1.50;1.83]	2.00 [1.90;2.10]	<0.001
IL1β suero 24 horas	1.90 [1.60;2.20]	1.60 [1.50;1.70]	2.10 [2.00;2.20]	<0.001
IL1β drenaje 6 horas	30.90 [12.10;56.10]	37.20 [14.10;69.20]	19.55 [6.28;41.45]	0.073
IL1β drenaje 24 horas	52.85 [25.45;95.43]	40.70 [23.30;71.40]	56.70 [30.80;119.25]	0.307
TNF-α suero preoperatorio	3.60 [3.40;3.70]	3.70 [3.45;3.75]	3.55 [3.25;3.70]	0.371
TNF-α suero 24 horas	3.60 [3.15;3.75]	3.70 [3.60;3.90]	3.45 [3.10;3.70]	0.019
TNF-α drenaje 6 horas	40.40 [19.15;101.80]	39.90 [20.10;100.52]	40.40 [15.80;101.80]	0.823
TNF-α drenaje 24 horas	19.10 [3.90;108.50]	71.95 [16.68;121.52]	3.90 [3.60;28.70]	0.003
TGF-β suero preoperatorio	5.80 [4.90;8.71]	8.75 [5.63;27.65]	5.15 [4.41;5.98]	<0.001
TGF-β suero 24 horas	6.14 [5.18;34.86]	35.14 [8.12;1587.70]	5.25 [4.76;5.98]	<0.001
TGF-β drenaje 6 horas	6.72 [5.74;10.01]	8.82 [5.74;19.32]	6.12 [5.88;7.36]	0.131
TGF-β drenaje 24 horas	8.05 [6.09;11.09]	10.92 [8.54;15.82]	6.16 [5.74;6.86]	<0.001

*Mediana (1er Cuartíl;3er Cuartíl)** U de Mann Withney

Tabla 23 (continuación): Análisis bivariante. *Elaboración propia*

4.3 ANÁLISIS MULTIVARIANTE

Posteriormente, analizamos los valores obtenidos a través de modelos ANOVA de medidas repetidas en los que hemos tenido en cuenta si las pacientes han recibido o no la RIO (grupo de casos y de controles), así como el tipo de muestra (suero o débito del drenaje quirúrgico) y el tiempo transcurrido desde la cirugía (preoperatorio, a las 6 horas y 24 horas desde la cirugía).

Se hallaron valores en algunas muestras que diferían considerablemente del resto de pacientes y parecían corresponder a errores o bien en la medición o en la base de datos, por lo que se decidió eliminarlos del análisis, considerándolos extremos o atípicos. Con el fin de ajustar la variabilidad propia del individuo estos pacientes no se tuvieron en cuenta en el análisis estadístico si alguna de las muestras involucradas presentaba estas magnitudes extremas.

4.3.1 Comparación suero preoperatorio y a las 24 horas desde la cirugía

4.3.1.1 IL6

En los valores obtenidos para IL6 se observa diferencias estadísticas significativas a nivel de caso-control y del tiempo (p valores <0.001 y 0.0096 respectivamente). Los casos tienen medianas y variabilidades similares, mientras que los controles tienen medianas superiores, y además un comportamiento diferente ya que se produce un aumento, de una mediana de 25.6 pg/ml a 39.1pg/ml cuando pasan 24 horas desde la cirugía.

Se objetivaron dos valores con magnitudes muy superiores al resto, uno perteneciente al grupo de casos y otro al de controles, por lo que se decidió eliminarlos de la muestra. El p valor relativo al comportamiento de casos y controles en función del paso del tiempo teniendo en cuenta esos valores resultaba 0.0446, muy cercano a 0.05, mientras que al eliminarlos, este comportamiento se igualaba (p valor 0.1013). Como únicamente se trata de 2 sujetos con valores atípicos, parece que eliminar esos valores de la muestra tiene sentido (figura 31, tabla 25).

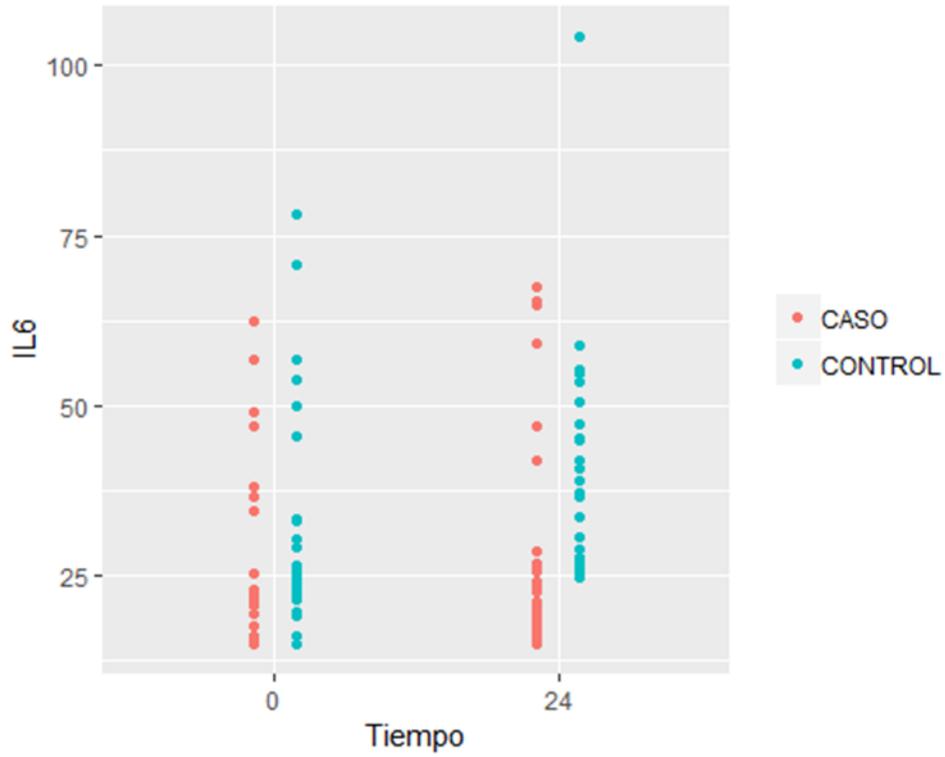


Figura 32: IL6 suero preoperatorio-24 horas. *Elaboración propia*

	Caso		Control		P valores		
	Preop.	24 horas	Preop.	24 horas	p Caso-Control	p Tiempo	p Interaccion
IL6*	20.7 (15.7-34.5)	22.7 (16.1-26.9)	25.6 (23.2-33.3)	39.1 (27.8-47.2)	<0.0001	0.0096	0.1013

*Mediana (primer cuartil-tercer cuartil)

Tabla 24: IL6 suero preoperatorio-24 horas. *Elaboración propia*

Resultados

4.3.1.2 CXCL10

En cuanto a los valores objetivados para CXCL10, se observa una variabilidad grande de los datos tanto en casos como en controles en los dos tiempos medidos. La interacción entre tiempo y variable caso control es significativa (p valor 0.0051). Claramente se ve un comportamiento diferente entre casos y controles en la medición. Mientras que en los casos se tienen medianas similares en ambos tiempos, de 69.8 pg/ml y 72.25 pg/ml respectivamente, en los controles se objetiva una disminución considerable, de 126 pg/ml en lo relativo a la mediana de los valores preoperatorios a 46.75 pg/ml a las 24 horas desde la cirugía (figura 32, tabla 26).

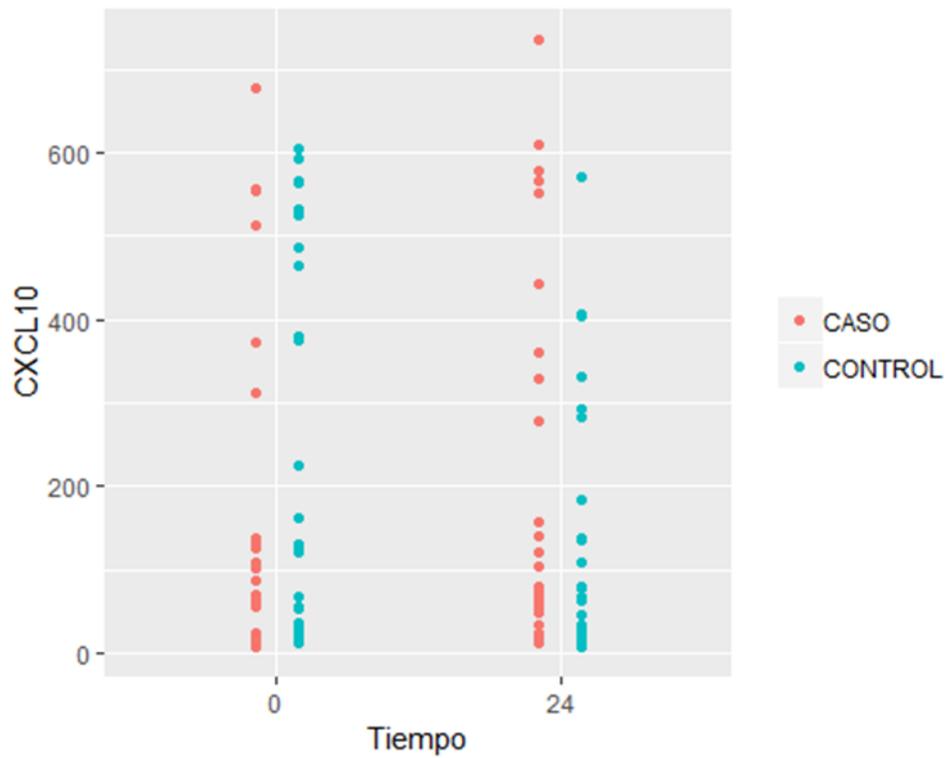


Figura 33: CXCL10 suero preoperatorio-24 horas. *Elaboración propia*

	Caso		Control		P valores		
	Preop.	24 horas	Preop.	24 horas	p Caso-Control	p Tiempo	p Interaccion
CXCL10*	69.8 (62.83-137)	72.25 (53.73-315.5)	126 (40.98-443.5)	46.75 (22.45-137.5)	0.4373	0.0602	0.0051

*Mediana (primer cuartil-tercer cuartil)

Tabla 25: CXCL10 suero preoperatorio-24 horas. *Elaboración propia*

Resultados

4.3.1.3 IL8

En el caso de los valores obtenidos para IL8, se observó que 3 pacientes pertenecientes al grupo de casos y uno al de controles tenían valores atípicos, por lo que se decidió de la misma manera que se ha explicado previamente, eliminarlos de la muestra.

Cabe destacar que unade los pacientes es la misma que tenía un valor extremo en la medición de IL6, por lo que quizás podría presentar alguna característica que determine estas alteraciones.

En los valores de IL8 no hay cambios significativos en los casos, ni en los controles respecto al tiempo, pero sí que hay diferencias entre el grupo de casos y el decontroles (p valor 0.0019). Los valores del grupo de los controles son superiores a los valores del grupo de los casos (figura 33, tabla 27).

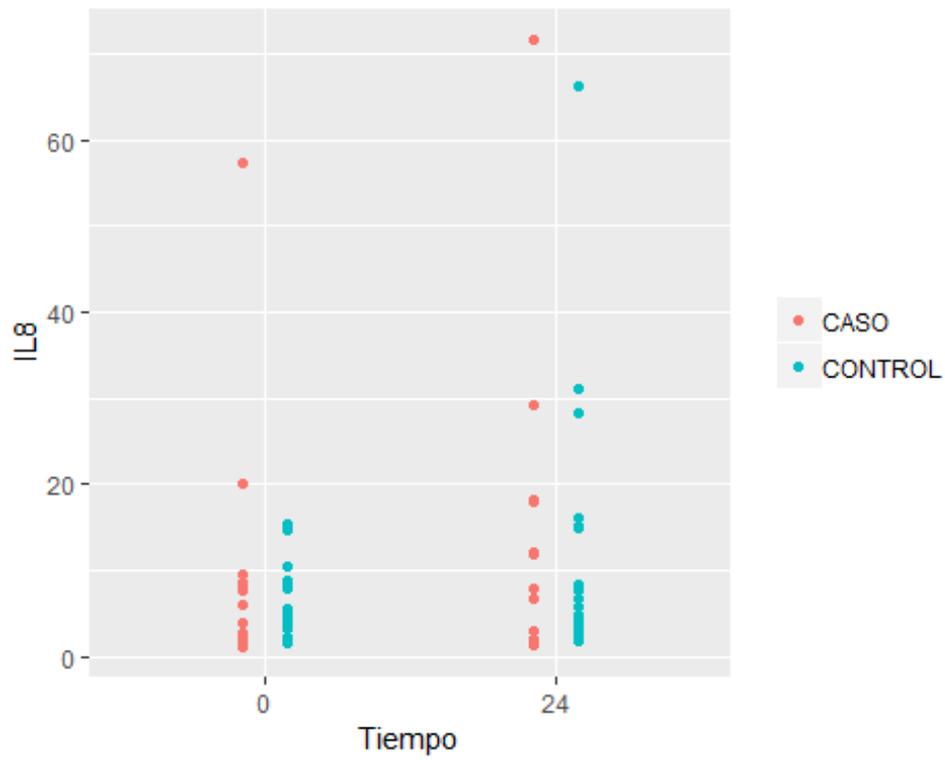


Figura 34: IL8 suero preoperatorio-24 horas. *Elaboración propia*

	Caso		Control		P valores		
	Preop.	24 horas	Preop.	24 horas	p Caso-Control	p Tiempo	p Interaccion
IL8*	2(1.7-6.8)	1.9(1.75-7.35)	4.4(2.3-8.1)	3.5(2.5-8.2)	0.0019	0.9715	0.9684

*Mediana (primer cuartil-tercer cuartil)

Tabla 26: IL8 suero preoperatorio-24 horas. *Elaboración propia*

Resultados

4.3.1.4 IL1 β

En la determinación de los valores de IL1 β encontramos una situación similar a lo referido con los valores de IL8.

En primer lugar, 3 pacientes, 2 de ellos pertenecientes al grupo de casos y uno al de controles presentan valores atípicos. Así mismo, en uno de los casos se trata de la misma paciente referida anteriormente con valores extremos.

Por último, no hay cambios significativos en los casos, ni en los controles respecto al tiempo, pero sí que hay diferencias entre el grupo de casos y el de controles (p valor <0.0001). Los valores del grupo de los controles son superiores a los valores del grupo de los casos (figura 34, tabla 28).

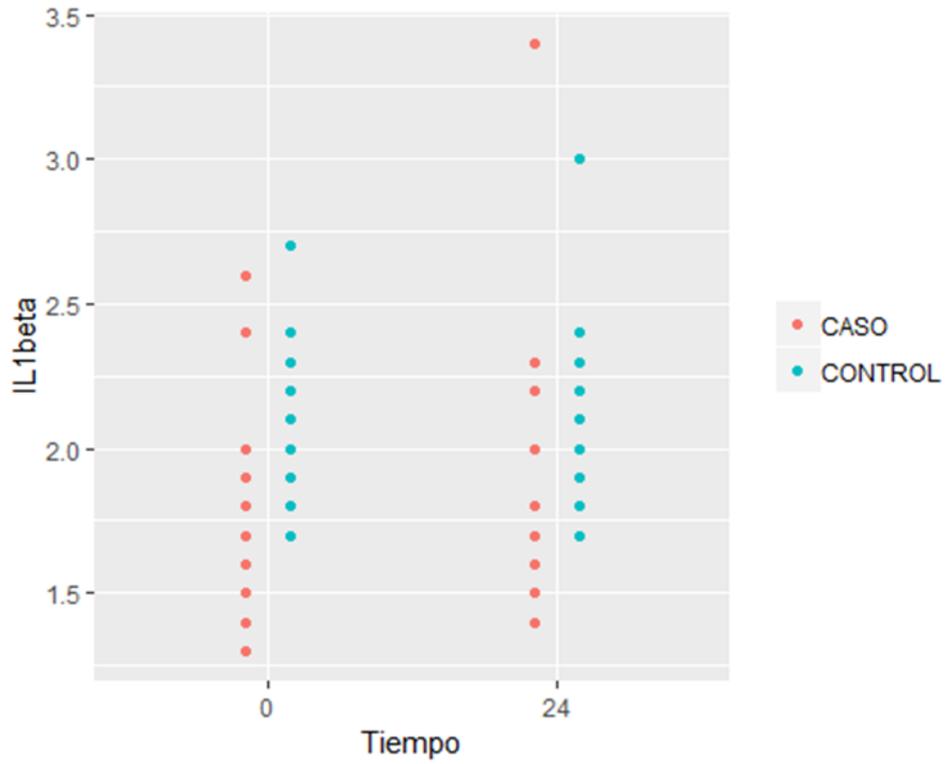


Figura 35: IL1β suero preoperatorio-24 horas. *Elaboración propia*

	Caso		Control		P valores		
	Preop.	24 horas	Preop.	24 horas	p Caso-Control	p Tiempo	p Interaccion
IL1beta*	1.7	1.6	2	2.1	<0.0001	0.8632	0.1993
	(1.5-1.83)	(1.5-1.7)	(1.9-2.1)	(2-2.2)			

*Mediana (primer cuartil-tercer cuartil)

Tabla 27: IL1β suero preoperatorio-24 horas. *Elaboración propia*

Resultados

4.3.1.5 TNF- α

En la medición de TNF- α se eliminó un paciente perteneciente al grupo de los casos por valor atípico, que difería en extremo del resto de la muestra, probablemente por un error en la medición.

Los valores resultaron superiores en los casos que en los controles (p valor 0.0270). Además, el grupo de casos y el de controles no se comporta de la misma manera con el paso del tiempo, mientras que el grupo de casos mantiene mediana y variabilidad, en el grupo de controles se observa una disminución de la mediana y un aumento de la variabilidad de los datos (p valor 0.0433) (figura 35, tabla 29).

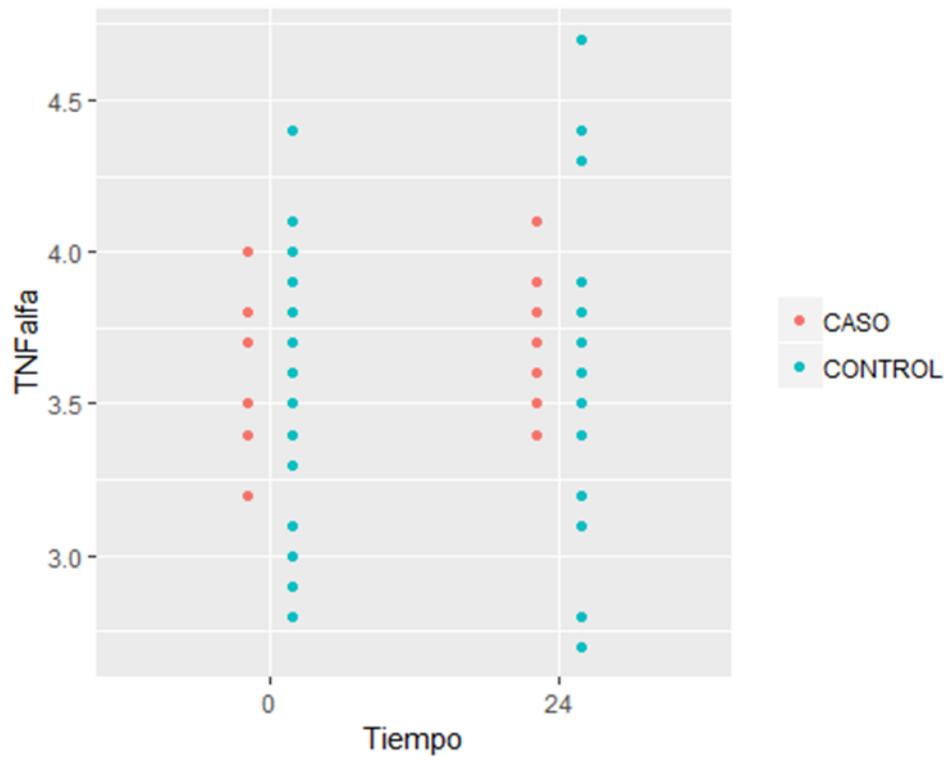


Figura 36: TNF- α suero preoperatorio-24 horas. *Elaboración propia*

	Caso		Control		P valores		
	Preop.	24 horas	Preop.	24 horas	p Caso-Control	p Tiempo	p Interaccion
TNF-α*	3.7	3.7	3.55	3.45	0.0270	0.4363	0.0433
	(3.45-3.75)	(3.6-3.9)	(3.25-3.7)	(3.1-3.7)			

*Mediana (primer cuartil-tercer cuartil)

Tabla 28: TNF- α suero preoperatorio-24 horas. *Elaboración propia*

Resultados

4.3.1.6 TGF- β

En la medición de TGF- β en suero comparando sus valores preoperatorios y a las 24 horas desde la cirugía, observamos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, así como en su evolución en el tiempo y la forma de comportarse a través de él (p valores <0.001, 0.009 y 0.0409 respectivamente). Mientras que en el grupo de pacientes que no han recibido la RIO no se observa una variación en el tiempo, medianas de 5.15 pg/ml y 5.25 pg/ml preoperatorias y a las 24 horas desde la cirugía respectivamente, en el grupo de pacientes que sí recibieron la RIO, las medianas aumentaron a las 24 horas respecto a los valores preoperatorios, 8.75 pg/ml y 35.14 pg/ml respectivamente.

Cabe destacar, que los valores objetivados en las muestras de suero de las pacientes que han recibido la RIO son superiores a los obtenidos en las muestras de las pacientes a las que se les sometió únicamente a cirugía conservadora, destacando en este grupo una serie de pacientes con cifras superiores a 1000 pg/ml (figura 36, 37, tabla 30).

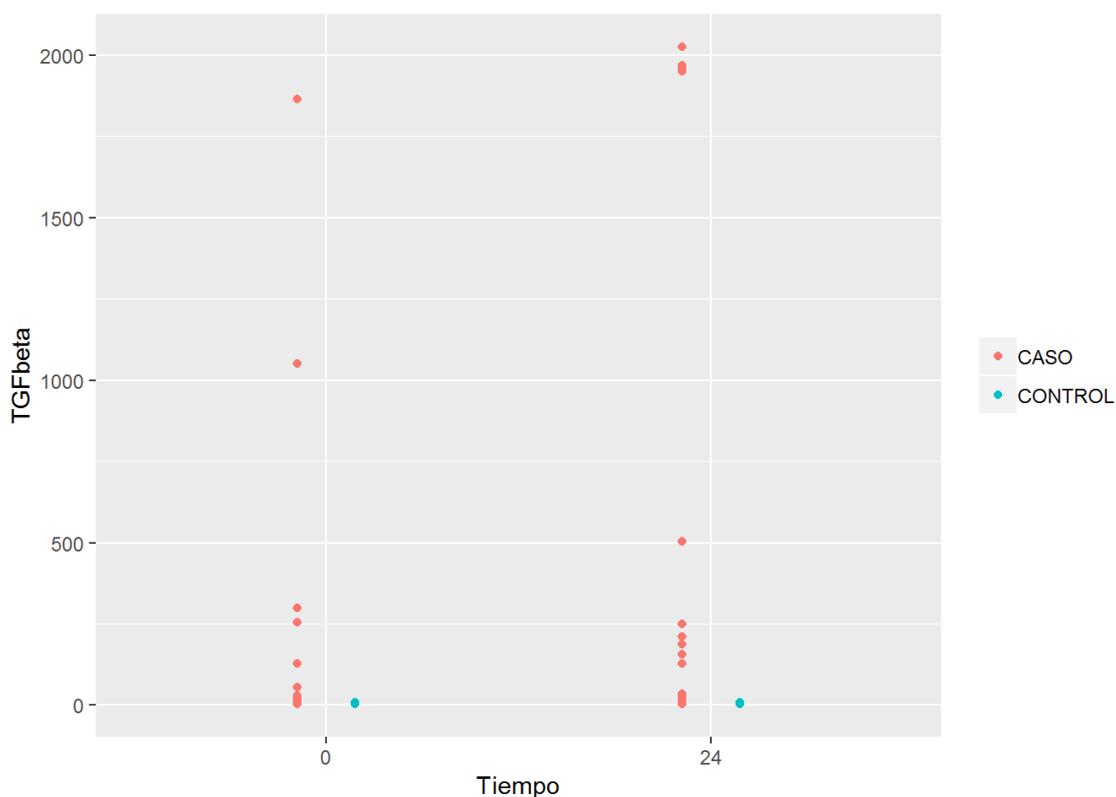


Figura 37: TGF- β suero preoperatorio-24 horas. *Elaboración propia*

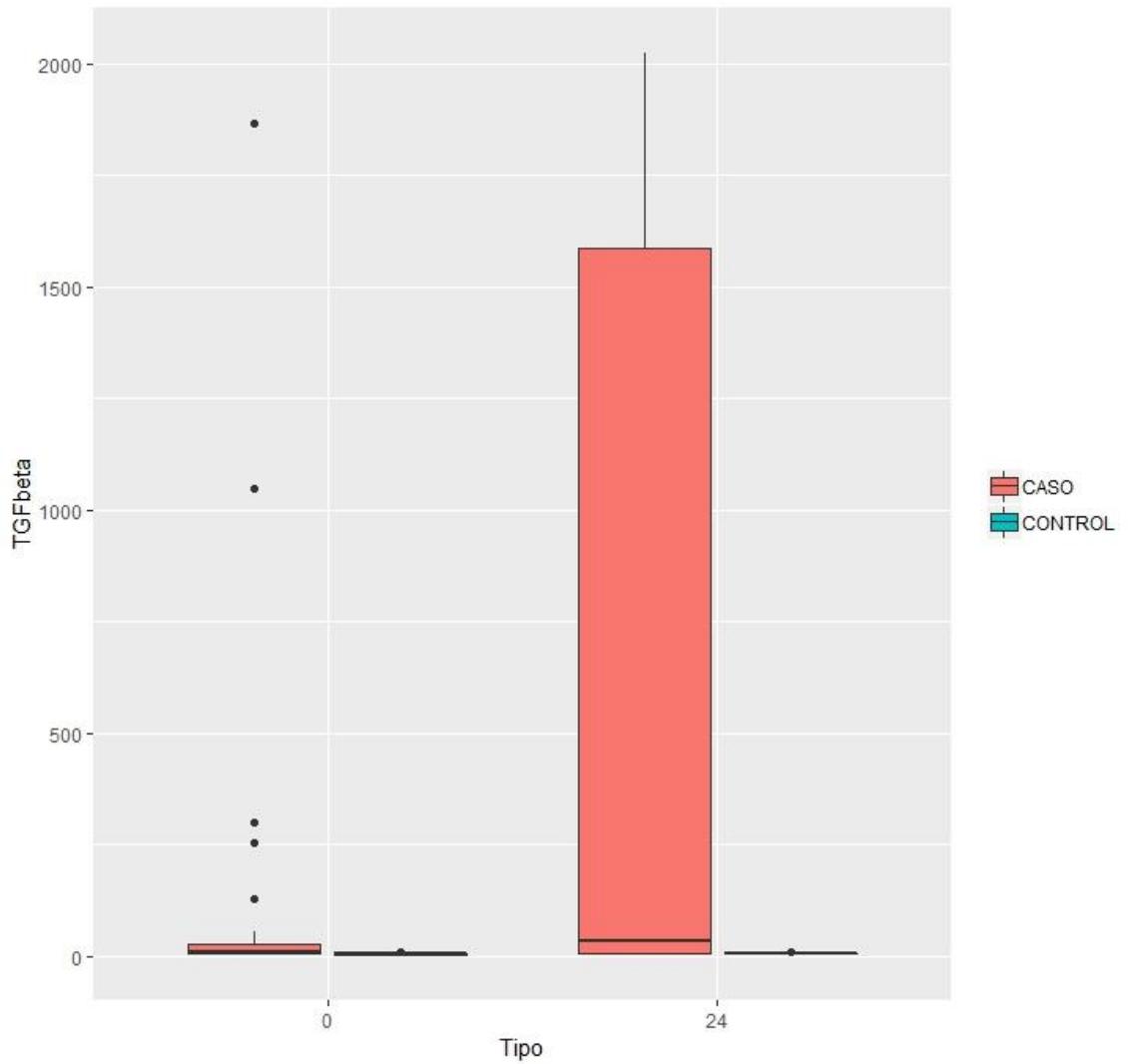


Figura 38: TGF- β suero preoperatorio-24 horas boxplot. *Elaboración propia*

	Caso		Control		P valores		
	Preop.	24 horas	Preop.	24 horas	p Caso-Control	p Tiempo	p Interaccion
TGF-β*	8.75 (5.63-27.65)	35.14 (8.12-1587.7)	5.15 (4.41-5.98)	5.25 (4.76-5.98)	<0.0001	0.0090	0.0409

*Mediana (primer cuartil-tercer cuartil)

Tabla 29: TGF- β suero preoperatorio-24 horas. *Elaboración propia*

4.3.2 Comparación drenaje a las 6 y 24 horas desde la cirugía

4.3.2.1 IL6

En la determinación de IL6 en drenaje quirúrgico a las 6 y 24 horas desde la cirugía se observa que hay diferencias estadísticamente significativas en la interacción entre la variable caso-control y el tiempo (p valor 0.0010).

En el grupo de pacientes que reciben la RIO se produce un descenso en la mediana a las 24 horas, cosa que no sucede en el grupo de pacientes que no reciben la RIO, donde la mediana a las 24 horas desde la cirugía es muy superior a la correspondiente a las 6 horas desde la intervención, de 130600 pg/ml y 39905 pg/ml respectivamente (figura 38, tabla 31).

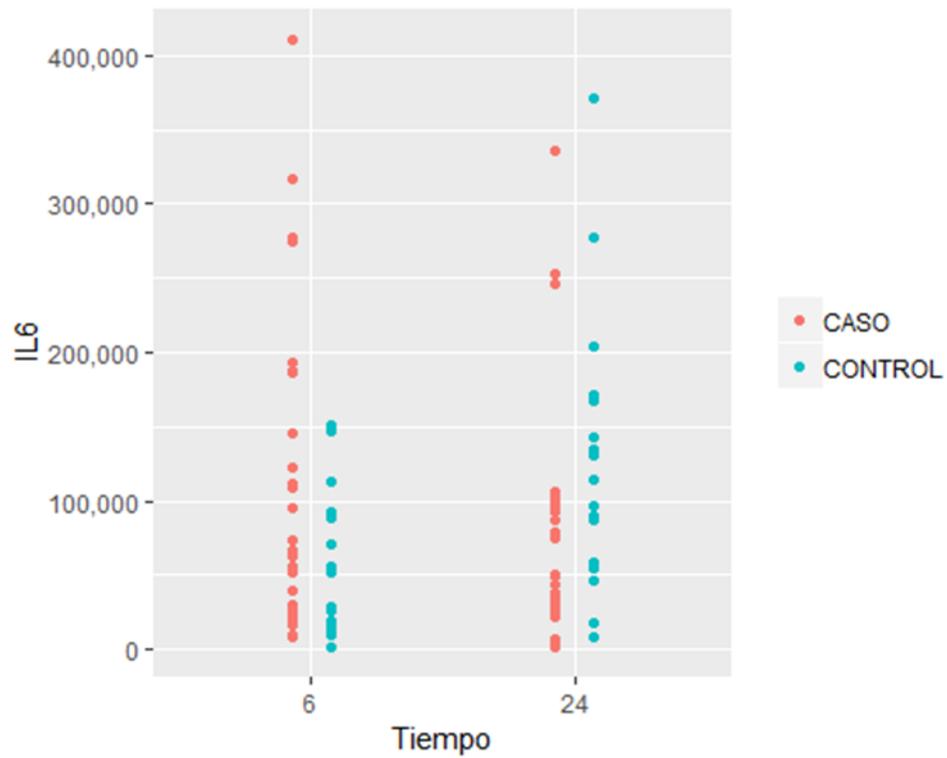


Figura 39: IL6 drenaje 6-24 horas. *Elaboración propia*

	Caso		Control		P valores		
	6 horas	24 horas	6 horas	24 horas	p Caso-Control	p Tiempo	p Interaccion
IL6*	66310	50630	39905	130600	0.6472	0.1516	0.0010
	(26560-186600)	(27120-92940)	(16442.5-91357.25)	(73030-154877.5)			

*Mediana (primer cuartil-tercer cuartil)

Tabla 30: IL6 drenaje 6-24 horas. *Elaboración propia*

Resultados

4.3.2.2 CXCL10

Los valores relativos a CXCL10 no muestran diferencias estadísticamente significativas a nivel de tiempo ni de la interacción, la forma de comportarse los grupos a través de él. Sin embargo, sí que objetivamos que hay diferencias entre el grupo de pacientes pertenecientes a los casos y a los controles (p valor <0.0001), siendo las medianas superiores tanto a las 6 como a las 24 horas desde la cirugía en el grupo de pacientes que no reciben la RIO (figura 39, tabla 32).

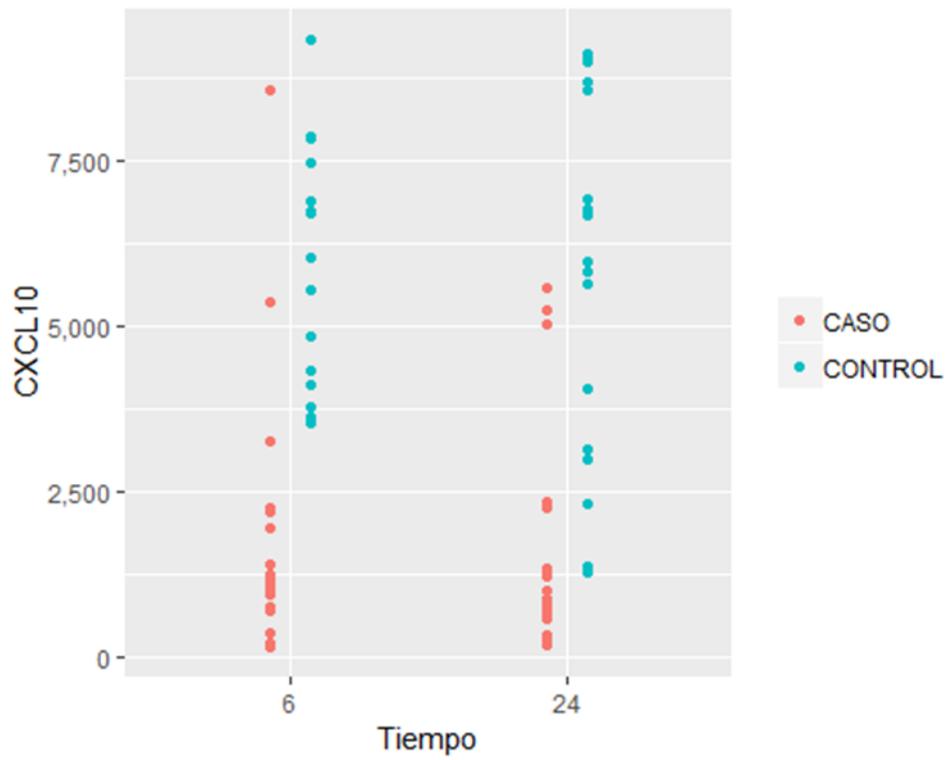


Figura 40: CXCL10 drenaje 6-24 horas. *Elaboración propia*

	Caso		Control		P valores		
	6 horas	24 horas	6 horas	24 horas	p Caso-Control	p Tiempo	p Interaccion
CXCL10*	1045 (712-1395)	708 (335-1255)	6037 (4172.5-6841.5)	5975 (3054.5-7744)	<0.0001	0.1045	0.4144

*Mediana (primer cuartil-tercer cuartil)

Tabla 31: CXCL10 drenaje 6-24 horas. *Elaboración propia*

Resultados

4.3.2.3 IL8

En el caso de los valores determinados para IL8, se observó que una paciente perteneciente al grupo de casos obtuvo un valor muy inferior al resto a las 24 horas desde la cirugía, por lo que se consideró un valor extremo.

De la misma manera que en el caso de los valores de CXCL10, solo se observa diferencia estadística entre el grupo de pacientes que reciben la RIO o no respectivamente (p valor <0.0001), siendo los valores de las medianas superiores en el grupo de controles (figura 40, tabla 33).

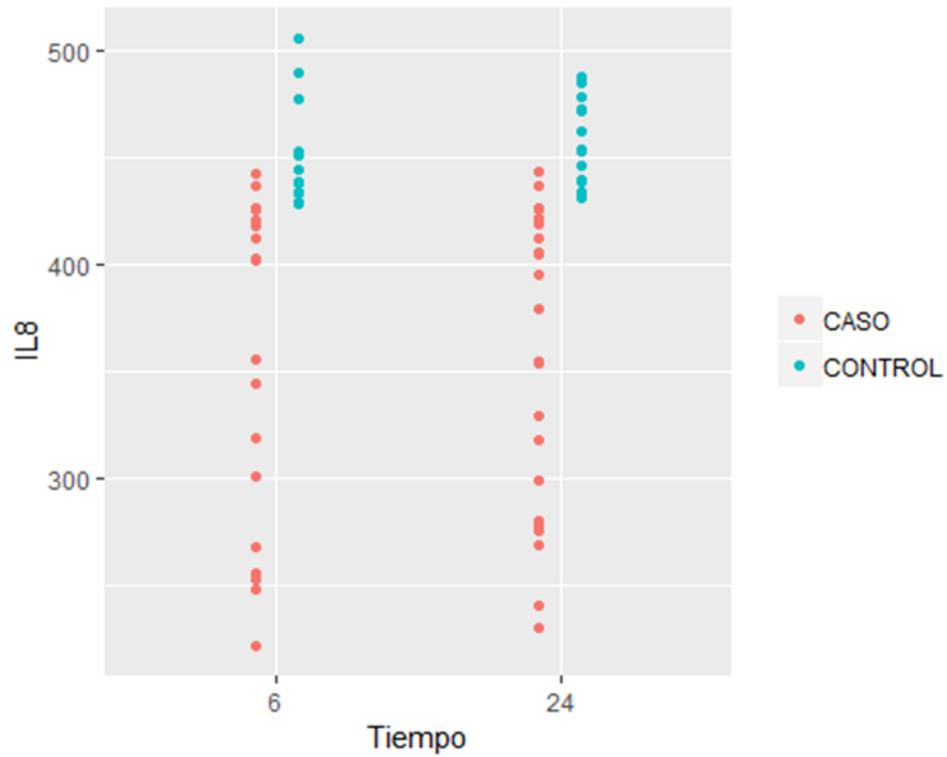


Figura 41: IL8 drenaje 6-24 horas. *Elaboración propia*

	Caso		Control		P valores		
	6 horas	24 horas	6 horas	24 horas	p Caso-Control	p Tiempo	p Interaccion
IL8*	414.85 (338.2-422.2)	400.2 (294.12-421.2)	438.45 (433.83-451.88)	453.1 (445.75-475.3)	<0.0001	0.4500	0.0964

*Mediana (primer cuartil-tercer cuartil)

Tabla 32: IL8 drenaje 6-24 horas. *Elaboración propia*

4.3.2.4 IL1 β

En lo que respecta a los valores determinados en drenaje quirúrgico de IL1 β observamos que en el grupo de pacientes que no han recibido RIO se produce un aumento significativo de la mediana con el paso del tiempo, de 19.55 pg/ml y 56.7 pg/ml respectivamente, mientras que en el grupo de pacientes que han recibido RIO, estos valores se mantienen estables, de 37.2 pg/ml y 40.7 pg/ml respectivamente.

Encontramos, por lo tanto, diferencias estadísticas significativas a nivel de tiempo e interacción (p valor 0.0025 y 0.0285 respectivamente) (figura 41, tabla 34).

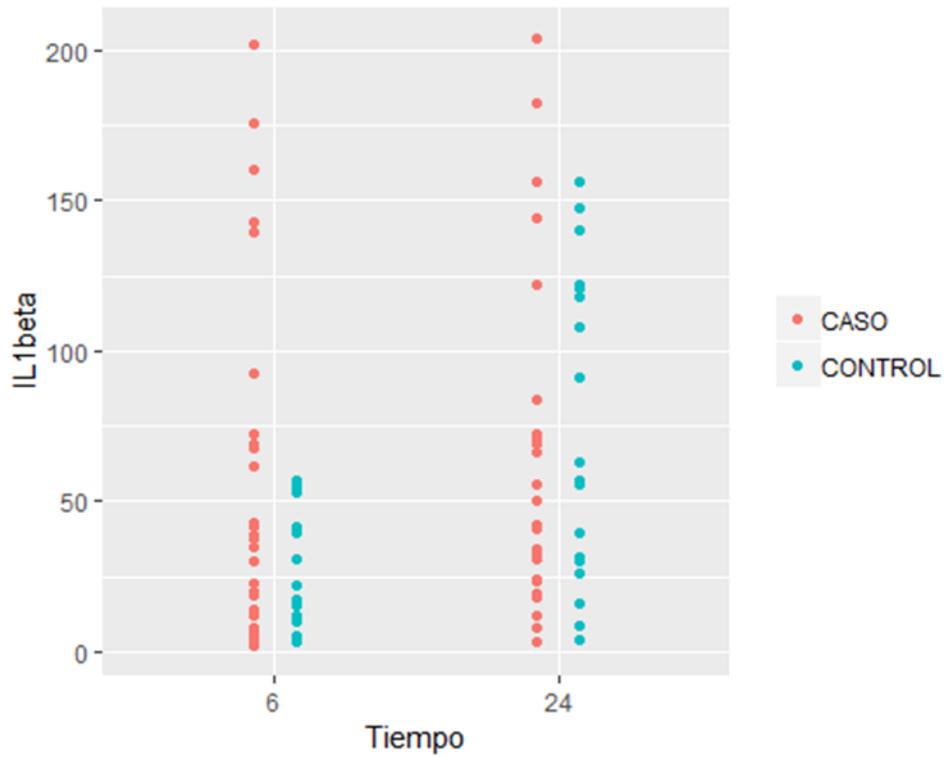


Figura 42: IL1 β drenaje 6-24 horas. *Elaboración propia*

	Caso		Control		P valores		
	6 horas	24 horas	6 horas	24 horas	p Caso-Control	p Tiempo	p Interaccion
IL1β*	37.2 (14.1-69.2)	40.7 (23.3-71.4)	19.55 (6.28-41.45)	56.7 (30.8-119.25)	0.6014	0.0025	0.0285

*Mediana (primer cuartil-tercer cuartil)

Tabla 33: IL1 β drenaje 6-24 horas. *Elaboración propia*

4.3.2.5 TNF- α

En los valores determinados para TNF- α , destacan una serie de sujetos, 2 pacientes pertenecientes al grupo de controles y 3 pacientes perteneciente al de casos, que obtienen valores por encima de 400 pg/ml, encontrándose el resto de la muestra en un rango de valores inferiores, por lo que se han considerado valores atípicos.

Se observan diferencias significativas a nivel de tiempo (p valor 0.0150) e interacción (p valor 0.0124) entre ambos grupos. Mientras que en las pacientes que reciben RIO se produce un aumento significativo de los valores con el tiempo, en las pacientes que no reciben RIO, se observa una disminución de estos valores (figura 42, tabla 35).

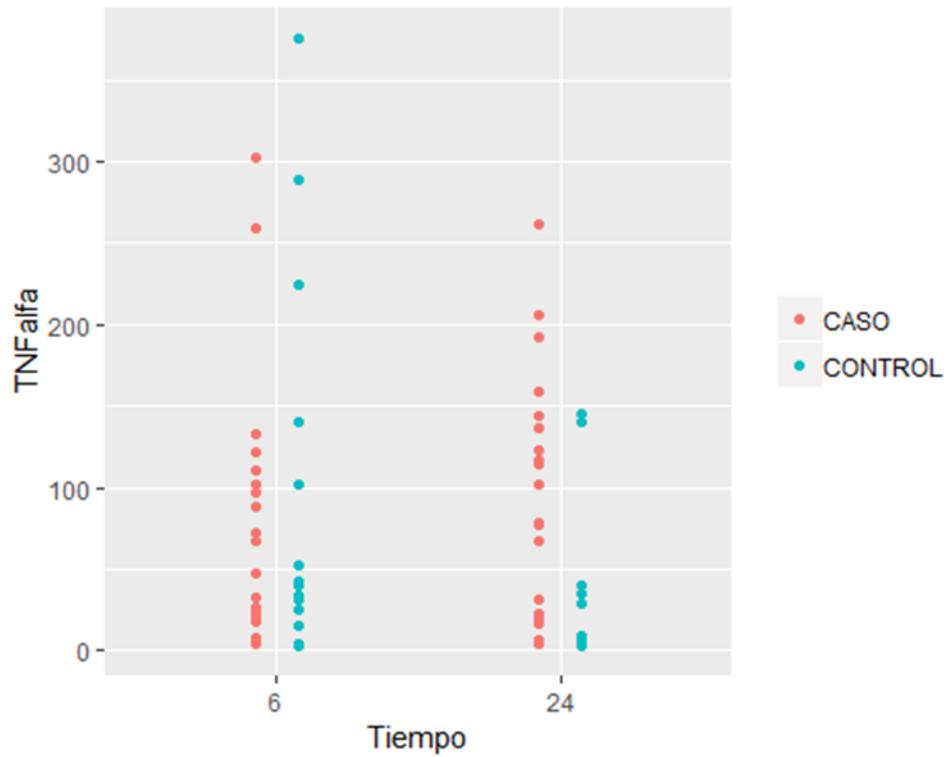


Figura 43: TNF- α drenaje 6-24 horas. *Elaboración propia*

	Caso		Control		P valores		
	6 horas	24 horas	6 horas	24 horas	p Caso-Control	p Tiempo	p Interaccion
TNF-α*	39.9 (20.1-100.52)	71.95 (16.68-121.52)	40.4 (15.8-101.8)	3.9 (3.6-28.7)	0.0804	0.0150	0.0124

*Mediana (primer cuartil-tercer cuartil)

Tabla 34: TNF- α drenaje 6-24 horas. *Elaboración propia*

Resultados

4.3.2.6 TGF- β

Cuando comparamos los valores obtenidos en la muestra de drenaje a las 6 y 24 horas desde la cirugía respectivamente entre los grupos, objetivamos diferencias estadísticamente significativas entre ellos, siendo los valores superiores en el grupo de pacientes que han recibido la RIO (p valor 0.0001). Sin embargo, no se evidencian diferencias en relación al tiempo transcurrido desde la cirugía ni en la forma de comportarse de ambos grupos (figura 43, 44, tabla 36).

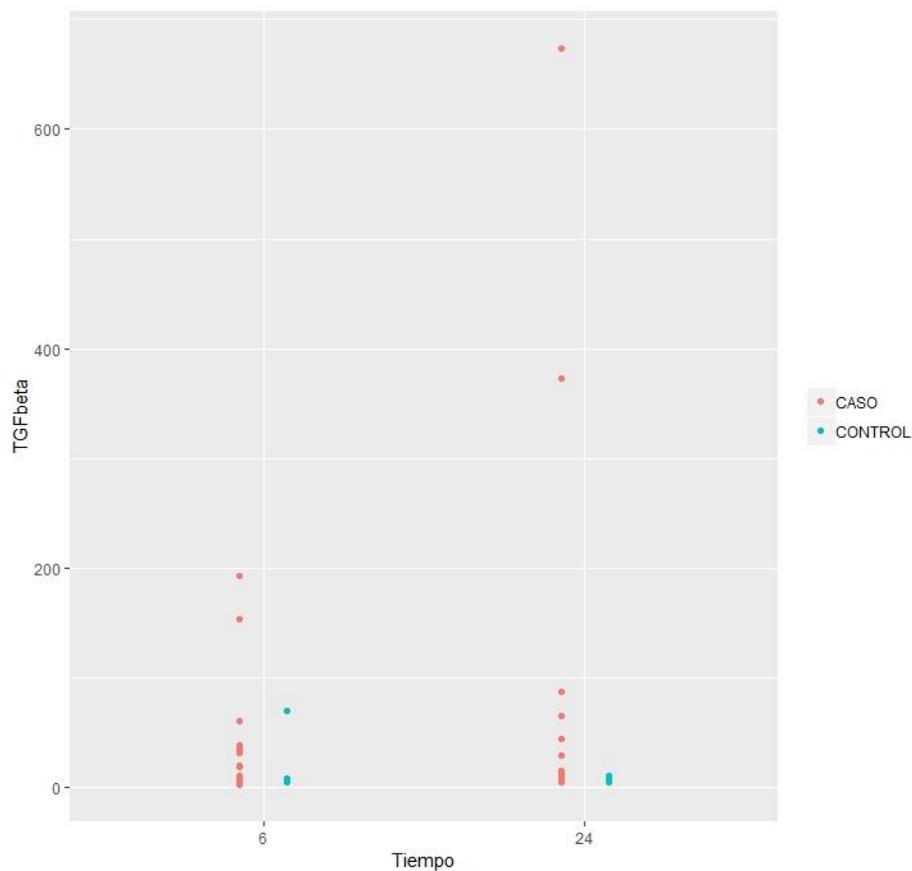


Figura 44: TGF- β drenaje 6-24 horas. *Elaboración propia*

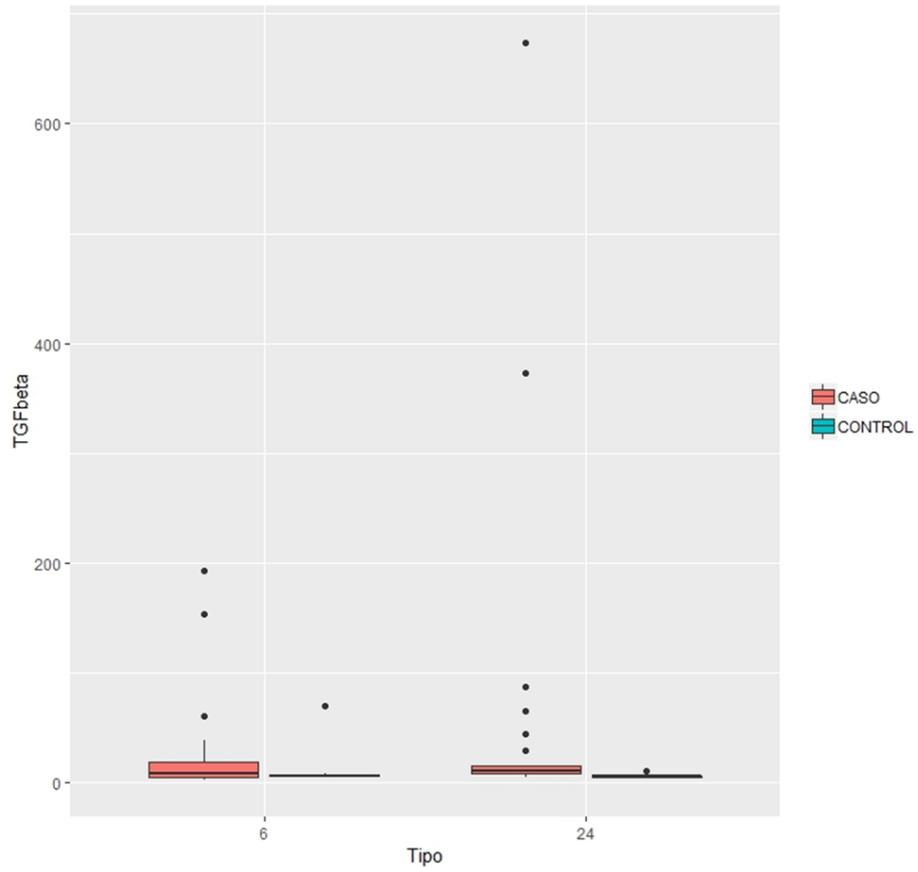


Figura 45: TGF-β drenaje 6-24 horas boxplot. *Elaboración propia*

	Caso		Control		P valores		
	6 horas	24 horas	6 horas	24 horas	p Caso-Control	p Tiempo	p Interaccion
TGF-β*	8.82	10.92	6.12	6.16	0.0001	0.2168	0.0799
	(5.74-19.32)	(8.54-15.82)	(5.88-7.36)	(5.74-6.86)			

*Mediana (primer cuartil-tercer cuartil)

Tabla 35: TGF-β drenaje 6-24 horas. *Elaboración propia*

4.3.3 Comparación suero y drenaje a las 24 horas desde la cirugía

4.3.3.1 IL6

Comparando los valores obtenidos de las muestras recogidas a las 24 horas desde la cirugía tanto de suero como de débito de drenaje en ambos grupos, observamos que para los valores de IL6 existen diferencias de magnitud considerables, siendo mayores y con una variabilidad de igual forma mayor en el débito de drenaje tomado a nivel local.

Encontramos diferencias significativas según las pacientes pertenezcan al grupo de casos o de controles, y según el tipo de muestra utilizada (p valor <0.0001) (figura 45, tabla 37).

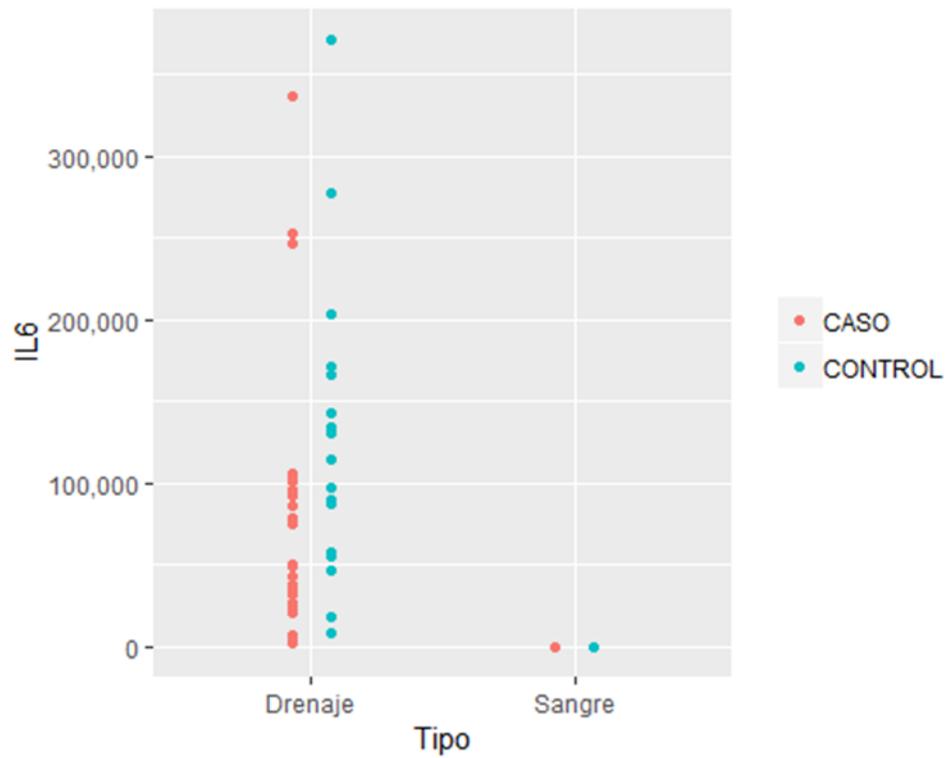


Figura 46: IL6 suero-drenaje 24 horas. *Elaboración propia*

	Caso		Control		P valores		
	Drenaje	Suero	Drenaje	Suero	P Caso-Control	p Tipo	p Interaccion
IL6*	49915	23.05	122550	39.1	<0.0001	<0.0001	0.5681
	(26255-93677.5)	(16.85-27.35)	(65655-160788.75)	(26.8-46.65)			

*Mediana (primer cuartil-tercer cuartil)

Tabla 36: IL6 suero-drenaje 24 horas. *Elaboración propia*

Resultados

4.3.3.2 CXCL10

En el caso de los valores determinados para CXCL10, se observa de igual forma a los valores previos para IL6, diferencias de magnitud importantes, siendo mayores en el débito de drenaje.

En este caso, no encontramos diferencias significativas entre el grupo de casos y controles (p valor 0.0852). Sin embargo, se observan diferencias a nivel longitudinal y por el tipo de muestra que utilizemos (p valor <0.0001) (figura 46, tabla 38).

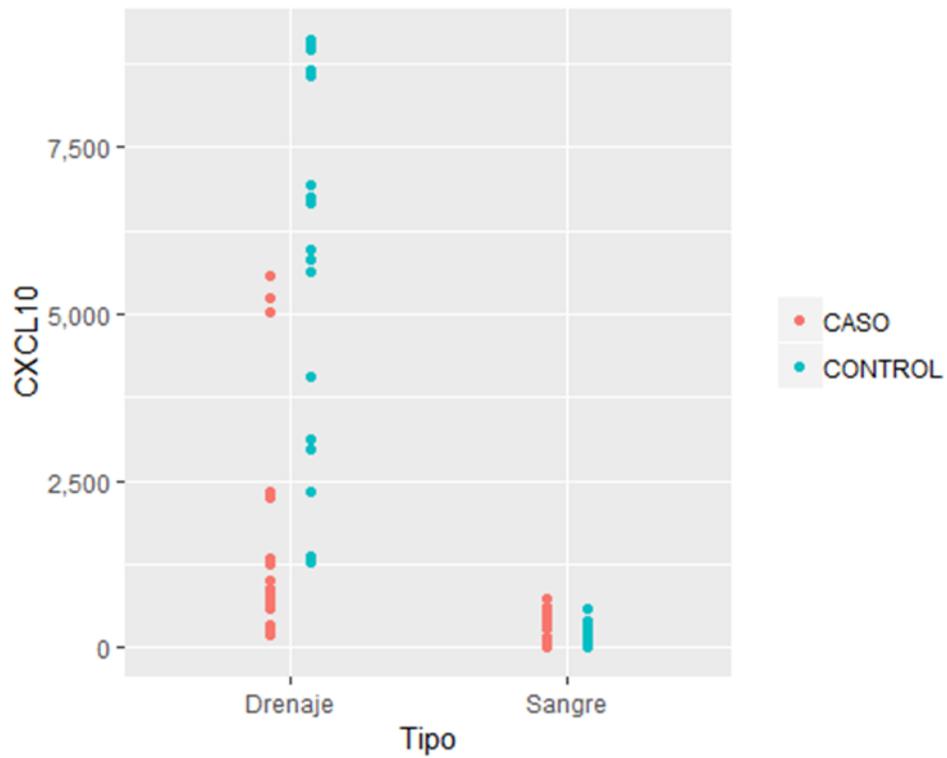


Figura 47: CXCL10 suero-drenaje 24 horas. *Elaboración propia*

	Caso		Control		P valores		
	Drenaje	Suero	Drenaje	Suero	P Caso-Control	p Tipo	p Interaccion
CXCL10*	708 (335-1255)	72.25 (53.73-315.5)	5975 (3054.5-7744)	46.75 (22.45-137.5)	0.0852	<0.0001	<0.0001

*Mediana (primer cuartil-tercer cuartil)

Tabla 37: CXCL10 suero-drenaje 24 horas. *Elaboración propia*

Resultados

4.3.3.3 IL8

Los valores objetivados de IL8 en la comparativa de suero y drenaje quirúrgico a las 24 horas desde la cirugía muestran diferencias significativas a nivel longitudinal, por el tipo de muestra y en el caso de que las pacientes reciban o no RIO (p valor <0.0001, <0.0001 y 0.0061 respectivamente).

De la misma manera que en los casos anteriores, observamos que la magnitud de los valores en el débito del drenaje quirúrgico es mayor (figura 47, tabla 39).

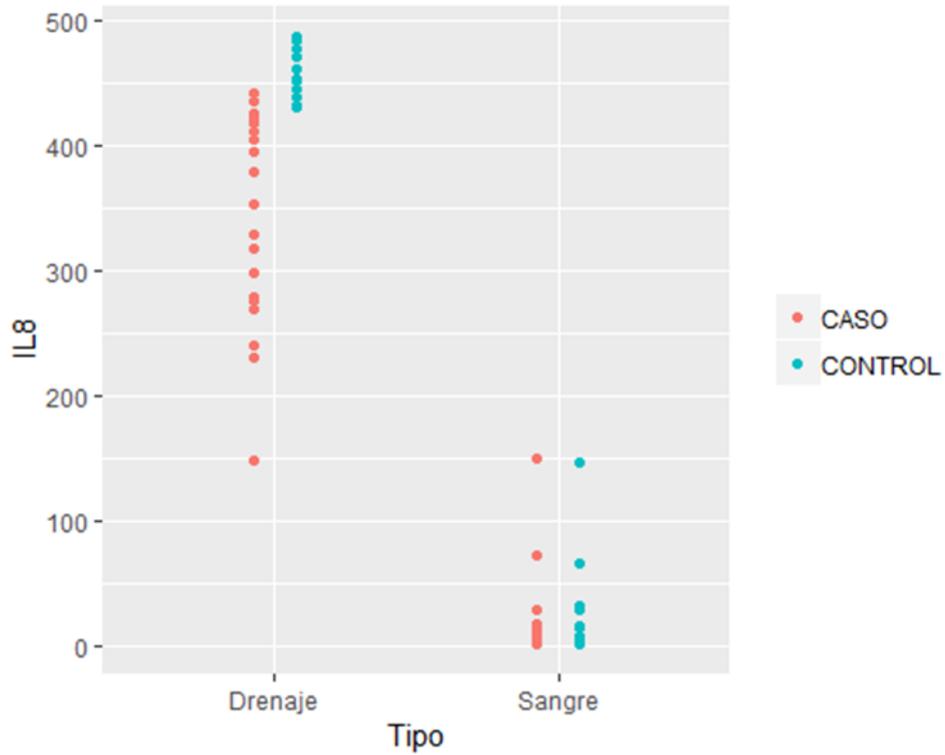


Figura 48: IL8 suero-drenaje 24 horas. *Elaboración propia*

	Caso		Control		P valores		
	Drenaje	Suero	Drenaje	Suero	P Caso-Control	p Tipo	p Interaccion
IL8*	395.6 (279.8-421.2)	1.9 (1.7-6.8)	449.75 (445.72-476.75)	3.3 (2.5-15.05)	<0.0001	<0.0001	0.0061

*Mediana (primer cuartil-tercer cuartil)

Tabla 38: IL8 suero-drenaje 24 horas. *Elaboración propia*

Resultados

4.3.3.4 IL1 β

Los valores determinados para IL1 β vuelven a mostrar, igual que en los casos anteriores, diferencias de magnitud significativas, siendo los valores objetivados mayores en el débito de drenaje.

Se encuentran diferencias significativas según las pacientes pertenezcan al grupo que recibe RIO o no (p valor <0.0001), por el tipo de muestra (p valor <0.0001) y a nivel de la variable interacción (p valor 0.0056) (figura 48, tabla 40).

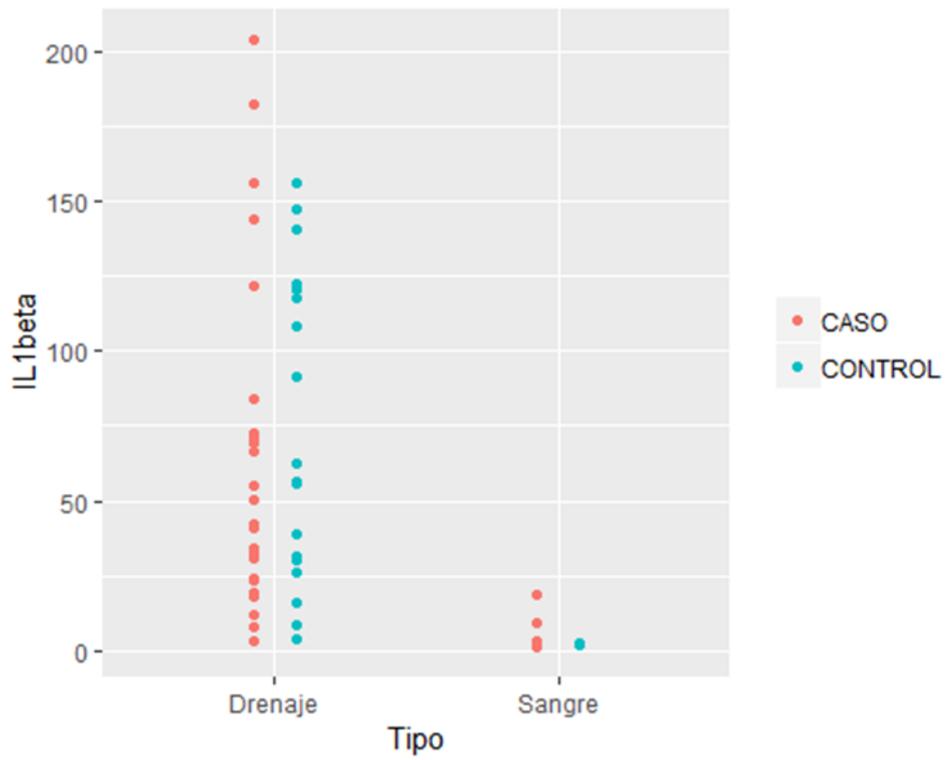


Figura 49: IL1 β suero-drenaje 24 horas. *Elaboración propia*

	Caso		Control		P valores		
	Drenaje	Suero	Drenaje	Suero	P Caso-Control	p Tipo	p Interaccion
IL1β*	34.1 (21.3-70.4)	1.6 (1.5-1.7)	56.7 (30.8-119.25)	2.2 (2-2.25)	<0.0001	<0.0001	0.0056

*Mediana (primer cuartil-tercer cuartil)

Tabla 39: IL1 β suero-drenaje 24 horas. *Elaboración propia*

Resultados

4.3.3.5 TNF- α

En cuanto a los valores objetivados para TNF- α , destacan los valores relativos al débito de drenaje quirúrgico a las 24 horas desde la cirugía en el grupo de pacientes que reciben la RIO, con mediana de 66.9 pg/ml.

Se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles, así como por el tipo de muestra, suero o drenaje quirúrgico, utilizado (p valor <0.0001) (figura 49, tabla 41).

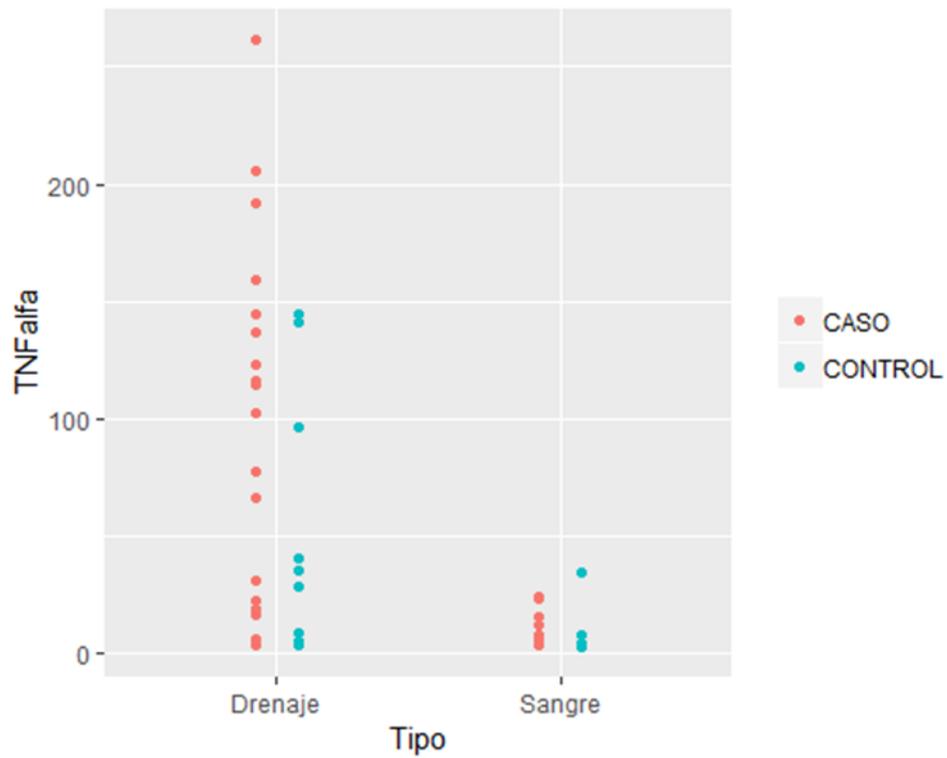


Figura 50: TNF- α suero-drenaje 24 horas. *Elaboración propia*

	Caso		Control		P valores		
	Drenaje	Suero	Drenaje	Suero	P Caso-Control	p Tipo	p Interaccion
TNF-α*	66.9 (7.52-131.73)	3.75 (3.62-3.9)	3.9 (3.6-13.78)	3.15 (3.1-3.5)	<0.0001	<0.0001	0.3758

*Mediana (primer cuartil-tercer cuartil)

Tabla 40: TNF- α suero-drenaje 24 horas. *Elaboración propia*

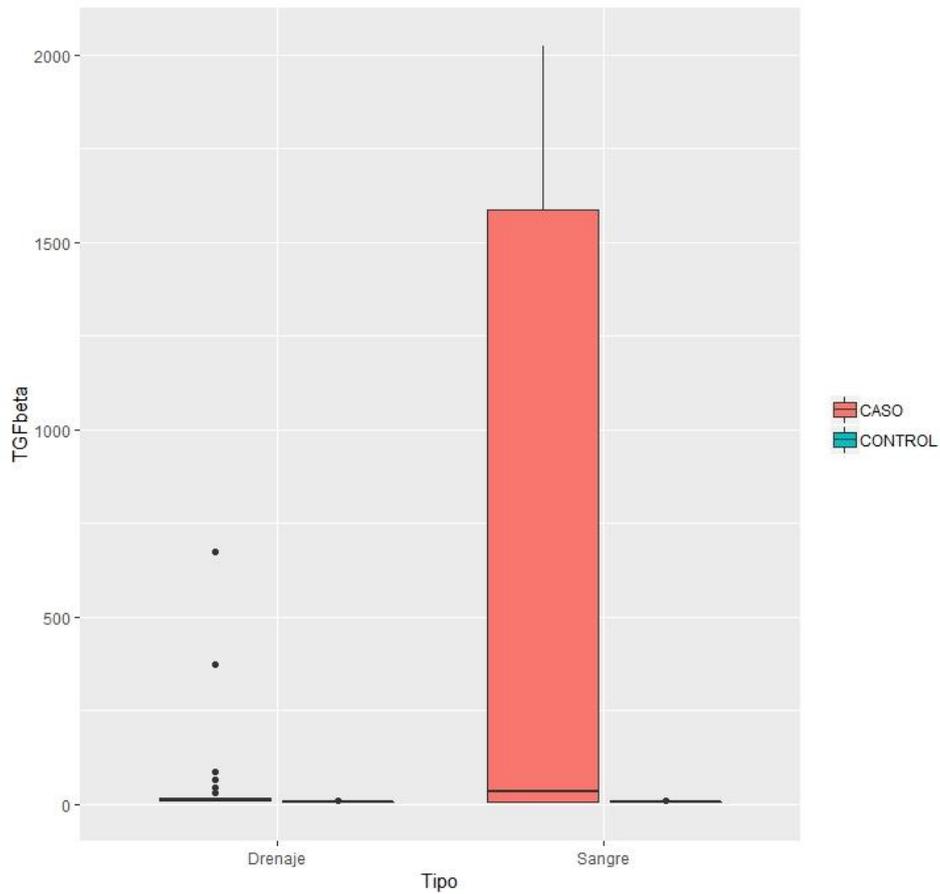


Figura 52: TGF- β suero-drenaje 24 horas boxplot. *Elaboración propia*

	Caso		Control		P valores		
	Drenaje	Suero	Drenaje	Suero	P Caso-Control	p Tipo	p Interaccion
TGF-β*	10.92 (8.54-15.82)	35.14 (8.12-1587.7)	6.16 (5.74-6.86)	5.25 (4.76-5.98)	<0.0001	0.5881	0.0001

*Mediana (primer cuartil-tercer cuartil)

Tabla 41: TGF- β suero-drenaje 24 horas. *Elaboración propia*

4.4 VALORACIÓN DE FIBROSIS

Como se ha explicado previamente, el TGF- β es una citoquina que se ha relacionado con la fibrosis inducida después de la radiación que podría servir como marcador temprano del riesgo de desarrollo de la misma.

Un total de 10 pacientes fueron invitadas a realizar una valoración clínica según la escala SOMA/LENT (tabla 14) del grado de fibrosis tras 24 meses desde la cirugía conservadora del cáncer de mama asociada a RIO por presentar valores elevados de TGF- β en las muestras.

Los resultados de dicha valoración según la escala SOMA/LENT se muestran a continuación (tabla 43).

Fibrosis / Necrosis grasa	Grado	Nºpacientes (n. 10)
Inexistente	0	3
Incremento de la densidad poco palpable	1	3
Incremento de la densidad definido y solidez	2	3
Densidad muy marcada / Retracción	3	1

Tabla 42: Grado de fibrosis. *Elaboración propia*

Cabe destacar que una paciente con grado 2 según la escala SOMA/LENT, y otra con grado 3, recibieron posteriormente radioterapia externa.

A continuación se muestran las imágenes de las 10 pacientes tras 24 meses desde la cirugía conservadora del cáncer de mama asociada a RIO.



Figura 53: Grado de fibrosis 0. *Elaboración propia*

Resultados



Figura 54: Grado de fibrosis 1. *Elaboración propia*



Figura 55: Grado de fibrosis 2. *Elaboración propia*

Resultados

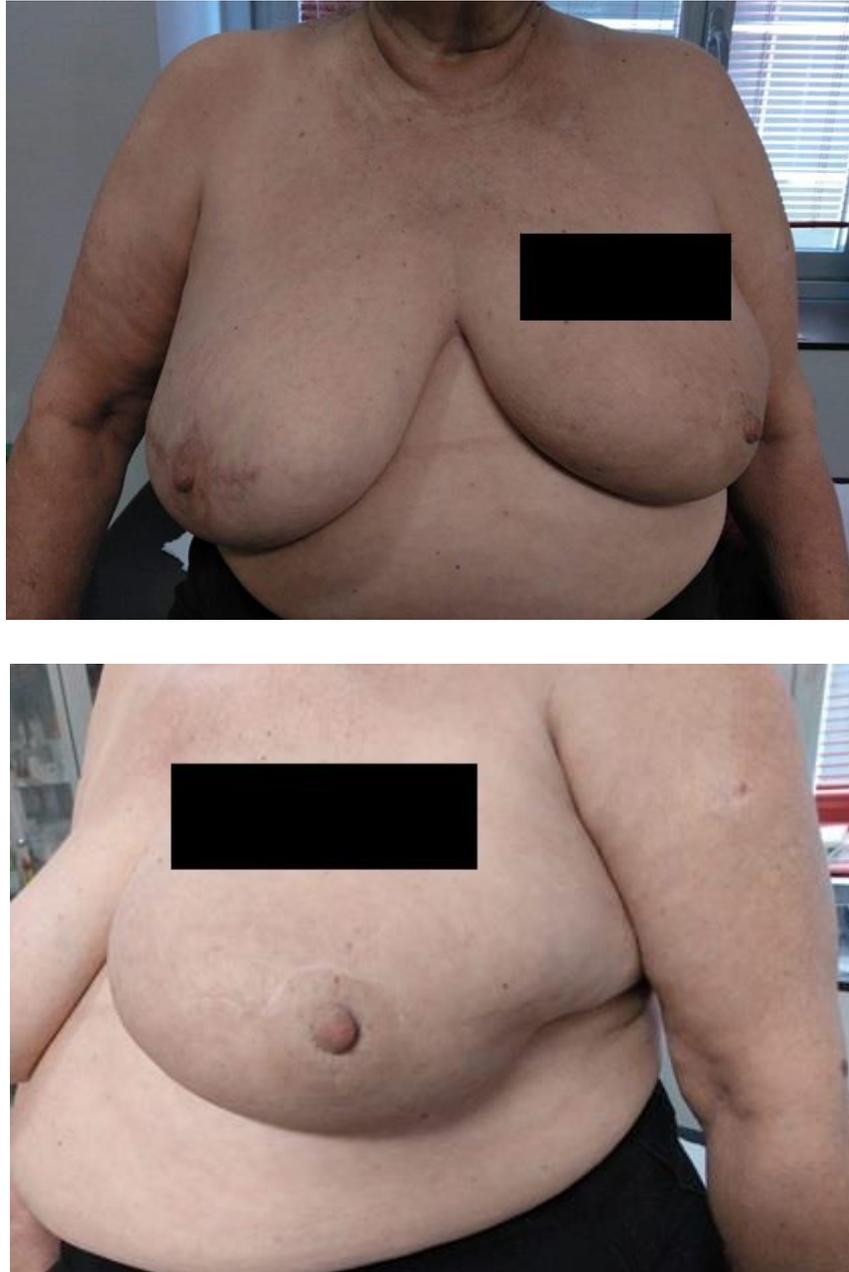


Figura 56: Grado de fibrosis 3. *Elaboración propia*

5. Discusión

5. DISCUSIÓN

El cáncer de mama es la primera causa de muerte por cáncer en mujeres españolas, aunque la mortalidad de esta enfermedad presenta una tendencia a la disminución debido fundamentalmente a un diagnóstico precoz por los métodos de cribado y a un mejor manejo terapéutico de las pacientes mediante una atención multidisciplinar.^{46, 55}

El tratamiento conservador de la mama junto con radioterapia es en la actualidad de elección en la mayoría de las pacientes. La radioterapia externa constituye el tratamiento más ampliamente aceptado e impacta tanto en el control local como en la supervivencia. Sin embargo, la tendencia actual consiste en utilizar técnicas de irradiación parcial acelerada, entre las que destaca la RIO, permitiendo utilizar dosis superiores y reduciendo la duración del tratamiento.^{1, 70-80}

Se ha visto que la cirugía representa un factor favorecedor del desarrollo de metástasis por sí misma en humanos, objetivándose que modifica el microambiente local. Por su parte, se han realizado estudios que sostienen que la radioterapia, además de afectar a la supervivencia de las células cancerígenas de forma directa, modifica así mismo el microambiente tumoral, alterando la cinética de crecimiento de dichas células, contrarrestando el efecto de la agresión quirúrgica e induciendo la respuesta inmunitaria. La RIO, además, al aplicarse de forma intraoperatoria, ofrece la posibilidad de estudiar este efecto en humanos sin intervalo libre de tratamiento.⁸⁸⁻⁹⁴

El efecto que tanto la cirugía como las nuevas terapias, entre las que se encuentra la RIO, tienen sobre el desarrollo del tumor, continúan siendo hoy en día objeto de estudio.

La hipótesis de nuestro estudio plantea que la RIO tras cirugía conservadora de cáncer de mama podría, además de esterilizar de células cancerígenas el lecho tumoral, alterar el microambiente del mismo, compensando el efecto de la agresión quirúrgica y favoreciendo los mecanismos de respuesta frente al tumor a través del sistema inmunológico.

Discusión

Para ello, basándonos en estudios previos sobre el conocimiento de la radiobiología tumoral, se determinaron los objetivos del proyecto y se llevó a cabo la cuantificación en suero y drenaje quirúrgico de proteínas involucradas en la cinética de crecimiento de las células tumorales de cáncer de mama (IL1 β , IL6, IL8, CXCL10, TGF- β , TNF- α) en pacientes a las que se les ha realizado cirugía conservadora asociada a RIO en comparación con aquellas que recibirán radioterapia externa según terapia convencional en lugar de RIO.

Según nuestro conocimiento de la bibliografía publicada, este es el primer estudio que compara los valores obtenidos de IL1 β , IL6, IL8, CXCL10, TGF- β y TNF- α , como método para valorar la respuesta biológica que produce la RIO en pacientes a las que se les ha sometido a cirugía conservadora del cáncer de mama aplicándoles RIO o no respectivamente y utilizando muestras de suero de forma preoperatoria y a las 24 horas desde la cirugía y de débito del drenaje quirúrgico a las 6 y 24 horas desde la cirugía.

Estudios previos han intentado dilucidar el efecto biológico de la RIO en cáncer de mama con resultados esperanzadores.

De esta forma, el grupo de Belletti et al.⁸⁸ objetivó menor migración, capacidad de invasión y proliferación de las células de cáncer de mama después de aplicar la RIO a través del análisis de mezclas de suero preoperatorio y drenaje quirúrgico a las 24 horas desde la cirugía. Además, determinaron una alteración de la expresión de proteínas en los débitos de drenaje quirúrgico, como una disminución de IL6 o IL8, relacionadas previamente con la progresión del tumor y consideradas como dianas para nuevas terapias.

Por su parte, otros autores han estudiado el efecto biológico de la RIO utilizando únicamente muestras de débito de drenaje quirúrgico a las 48 horas desde la cirugía mediante diferentes metodologías de estudio.

Zaleska et al.^{89,90} observaron que el débito del drenaje quirúrgico de las pacientes a las que se les había aplicado la RIO estimulaban en menor medida el desarrollo de las células CD44⁺/CD24^{low}, más agresivas, en comparación con aquellas que no habían recibido RIO.

Por su parte, el grupo de Piotrowski et al.⁹² estudiaron el daño producido en el DNA en dos líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7 y MDA-MB-468) y observaron que éste era mediado por un efecto de vecindad que se objetivaba tras la administración de la RIO.

Además, en un reciente estudio publicado por Kulcenty et al.^{93, 94} se ha determinado que el efecto que la cirugía tiene en la adquisición de un fenotipo más agresivo en las células tumorales del cáncer de mama relacionado con la transición epitelio-mesenquimal, se revierte tras la administración de la RIO mediado por el efecto de vecindad.

Grupo	Tamaño muestral	Tipo de muestra	Objeto de estudio
Belletti et al. ⁸⁸	45	Suero preoperatorio y drenaje quirúrgico 24 horas	Proteínas (IL6, IL8, IL10, IL7,...)
Zaleska et al. ⁸⁹	44	Drenaje quirúrgico 48 horas	Células CD44 ⁺ /CD24 ^{low} y ALDH1
Zaleska et al. ⁹⁰	42	Aspirado lecho quirúrgico 7 días	miR-21, miR-155 y miR-221
Piotrowsky et al. ⁹²	16	Drenaje quirúrgico 48 horas	Cambios DNA mediante marcadores (γ H2AX, cPARP,...)
Kulcenty et al. ⁹³	43	Drenaje quirúrgico 48 horas	Cambios DNA mediante marcadores (CD24, ALDH, N-cadherina,...)
Kulcenty et al. ⁹⁴	43	Drenaje quirúrgico 48 horas	RNA (transcriptoma)

Tabla 43: Estudios previos. *Elaboración propia*

Las investigaciones anteriores sobre los mecanismos que la RIO tiene para alterar el microambiente tumoral sugieren que éstos están en relación con una alteración en la expresión de las proteínas a nivel local que difieren significativamente entre pacientes a las que solo se les ha realizado cirugía conservadora del cáncer de mama y aquellas a las que se les ha asociado RIO, como ya señalaba el grupo de Belletti en el estudio del débito del drenaje quirúrgico.⁸⁸⁻⁹⁴

Consideramos que los resultados obtenidos en la determinación de las proteínas analizadas en nuestro estudio arrojan resultados más fiables al analizar las muestras de cada paciente de forma individual y poder comparar las muestras tanto de suero preoperatorio como a las 24 horas desde la cirugía, así como las del drenaje quirúrgico a las 6 y 24 horas desde la cirugía.

Por otra parte, la mayoría de los estudios coinciden en que la complicación más frecuente tras la aplicación de la RIO es la fibrosis, por lo que se hace mandatorio identificar marcadores que nos ayuden a predecirla.^{1, 95, 185} Diferentes autores como Li et al.¹⁶¹, Boothe et al.¹⁶² o Scherer et al.¹⁸⁶ señalan a TGF- β como el componente regulador principal desde fases iniciales de la fibrosis relacionada con la radiación, siendo activo tanto en suero como en drenaje quirúrgico de las pacientes. En este sentido, se formuló nuestro objetivo secundario consistente en valorar si niveles elevados de TGF- β en suero y drenaje quirúrgico después de la cirugía conservadora asociada a RIO en pacientes con cáncer de mama podría servir como marcador temprano del desarrollo de fibrosis.

5.1 VALIDEZ DEL ESTUDIO

Previo a la discusión de los resultados obtenidos en el estudio, consideramos importante discutir la validez del diseño del estudio empleado.

5.1.1 Selección de la muestra

Con el fin de probar los objetivos y aceptar la hipótesis planteada, se realizó, como ya se ha comentado previamente, un diseño específico para el estudio con criterios de inclusión y exclusión estrictos, que determinaron que tanto el grupo de casos como el de controles cumplieran los mismos requisitos para su participación.

Según la literatura revisada, otros trabajos publicados en la misma línea de investigación, no son tan estrictos en la aplicación de los criterios de inclusión y exclusión, lo que puede determinar que los grupos no sean comparables de una manera tan fiable. El grupo de Zaleska et al.⁹⁰ en su análisis del efecto de la RIO sobre el débito de drenaje quirúrgico mostraba un grupo de casos de pacientes a las que se le había aplicado la RIO con receptores hormonales de estrógeno y progesterona positivos en el 100% de los casos frente a un 95% en el grupo control en el que no se había administrado RIO. Por su parte, HER2 era negativo en el 100% de los casos, mientras que solo cumplía este criterio en el 90% de los controles.

Por otra parte, en nuestro estudio, se excluyó a las pacientes con tumor primario múltiple o con enfermedades sistémicas benignas con conocida alteración en las vías moleculares de las proteínas analizadas, como fue el caso de una paciente con enfermedad de Wernicke-Korsakoff, que puede presentar alteración en la función del sistema inmunológico, principalmente en lo relativo a los linfocitos T.¹⁹¹

5.1.2 Inmunodetección de proteínas

Todas las muestras fueron conservadas y analizadas por un único equipo investigador centralizado en el Servicio de Bioquímica Clínica del Hospital Universitario Miguel Servet, manteniendo de la misma manera una homogeneidad en las técnicas de inmunodetección de proteínas. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado para considerarse específicas y se utilizaron controles positivos y negativos, como marcan los cánones de la investigación científica.

5.1.3 Tamaño muestral

El tamaño muestral de nuestro estudio (n=60) se estableció mediante cálculo estadístico del número de pacientes necesarias para conseguir probar nuestros objetivos, teniendo en cuenta las limitaciones económicas, éticas y técnicas en la inmunodetección de proteínas que surgen por tratarse de un trabajo experimental prospectivo. Sin embargo, nuestro estudio está en consonancia con la mayoría de trabajos publicados en la literatura que realizan análisis en suero o débito del drenaje quirúrgico, que varía de 16 a 45 pacientes.⁸⁸⁻⁹⁴

5.2 DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA CASUÍSTICA

El presente estudio se planteó como un estudio prospectivo multicéntrico dividido en dos grupos comparativos con casos consecutivos de las pacientes a las que se les sometió a una cirugía conservadora por cáncer de mama asociada o no a RIO. Se reclutaron un total de 60 pacientes, que se dividieron para conformar el grupo de casos (aquellas que recibieron RIO) y el grupo de controles (con aplicación posterior de radioterapia convencional).

Todas las pacientes cumplieron los mismos criterios de inclusión y exclusión propuestos en el diseño del estudio, y se analizaron según un formulario específico una serie de características demográficas y clínicas del paciente, así como diagnósticas del cáncer de mama, datos quirúrgicos, anatomopatológicos y moleculares e inmunohistoquímicos, que concluyeron que los dos grupos eran comparables, sin observarse diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

Destaca el motivo de consulta que corresponde a nódulo mamario en la mayoría de las pacientes (93.33%) cuando lo esperable en este grupo con factores de buen pronóstico era que correspondiera a un hallazgo patológico en la mamografía de cribado.

Por otro lado, cabe remarcar que aunque el estudio ganglionar preoperatorio de todas las pacientes fue negativo, tras la realización de la BSGC, solo 21 pacientes del grupo de controles (70%) y 20 pacientes del grupo de casos (66.67%), obtuvieron un resultado finalmente negativo. En el resto de casos, el manejo terapéutico de las pacientes se decidió basándose en la decisión del comité de tumores que sigue las recomendaciones vigentes de las diferentes sociedades científicas que se han descrito previamente. Sin embargo, estos datos no supusieron una diferencia estadística significativa entre los grupos que los hiciera no comparables (p valor 0.3671).

Aunque nuestros datos de detección de ganglio centinela positivo son altos, están en concordancia con la literatura, que determina que la probabilidad de encontrar un ganglio centinela afectado en pacientes con estadios precoces de cáncer de mama sin evidencia clínica de enfermedad ganglionar es del 20 al 30%.^{192, 193}

5.3 RESPUESTA BIOLÓGICA DEL SISTEMA INMUNOLÓGICO

El conocimiento que tenemos de los efectos biológicos que la RIO promueve en las células tumorales y el microambiente tumoral de las pacientes con cáncer de mama es todavía limitado.

Sabemos que la cirugía desencadena un estado de inflamación que se relaciona con la promoción del tumor, aunque actualmente se considera a la inflamación y a la respuesta inmunitaria como procesos interconectados.

La RIO parece contrarrestar esos efectos negativos de la agresión quirúrgica a través de su interacción con el microambiente tumoral, postulándose que este efecto es mayor al aplicarse en el sitio quirúrgico en el momento de la intervención.

Los estudios publicados previamente por el grupo de Belletti et al.⁸⁸, Zaleska et al.^{89, 90}, Piotrowsky et al.^{91, 92} o Kulcenty et al.^{93, 94} sugieren que el efecto que produce la RIO se manifiesta en el débito del drenaje quirúrgico a nivel local con la alteración de la expresión de las citoquinas y otras proteínas del sistema inmunológico, y que pueden manifestarse así mismo a nivel sistémico reflejadas en las muestras de suero.

5.3.1 IL6 e IL8

Belletti et al.⁸⁸ demostraron una disminución de la expresión de IL6 e IL8 en drenaje quirúrgico tras la administración de RIO que se relaciona con una menor progresión del tumor, ya que estas citoquinas están involucradas en la adquisición de las células cancerígenas de mayor motilidad y capacidad migratoria, por la inducción de la EMT.¹²⁵ Además, la IL6 se ha relacionado previamente con la activación en las células tumorales de STAT3 y NGkB, lo que conlleva la inhibición de la apoptosis de las mismas.¹³⁷ Segatto et al.¹⁷¹ demostraron que los fluidos de la herida quirúrgica en pacientes con cáncer de mama estimulaban el desarrollo del tumor, lo que no ocurría si se inhibía STAT3. Por su parte, Zaleska et al.⁹⁰ corroboraron que uno de los mecanismos por los que la RIO podía contrarrestar el efecto de la agresión quirúrgica era la vía IL6-STAT3.

Discusión

En consonancia con sus resultados, nuestro estudio muestra una disminución estadísticamente significativa de IL6 en la muestra obtenida del drenaje quirúrgico a las 24 horas desde la cirugía (p valor 0.006). Además, mediante el análisis multivariante se observa como en el grupo de pacientes que no reciben la RIO los valores de IL6 se elevan de una forma estadísticamente significativa en la muestra de drenaje obtenida a las 24 horas desde la cirugía respecto a la obtenida a las 6 horas, cosa que no ocurre si se recibe la RIO (p valor 0.0010).

Así mismo, para los valores obtenidos para IL8 se observa que se produce una disminución estadísticamente significativa si se recibe la RIO tanto a las 6 como a las 24 horas desde la cirugía (p valor <0.001). Además, se objetiva la misma tendencia comentada para IL6, aunque en este caso no se alcanza la significación estadística (p valor 0.0964).

Sin embargo, los valores determinados tanto para IL6 como para IL8 deben analizarse con cautela ya que se han observado diferencias estadísticamente significativas en los valores preoperatorios en suero (p valor 0.014 y 0.016 respectivamente).

5.3.2 CXCL10

Estudios previos han relacionado la expresión de proteínas como CXCL10 con un mejor pronóstico en pacientes diagnosticadas con cáncer de mama, al promover la infiltración de linfocitos T CD8+ en el tumor.¹⁴⁰⁻¹⁴³ Sin embargo, según nuestro conocimiento de la bibliografía publicada, no existe ningún estudio con un diseño que haga nuestros resultados comparables.

Nuestros resultados no alcanzan la significación estadística entre casos y controles en las muestras obtenidas de suero a las 24 horas desde la cirugía (p valor 0.050), sin embargo, muestran una tendencia al aumento de CXCL10 en suero que no se observa en caso de no recibir la RIO que es estadísticamente significativa mediante el análisis multivariante (p valor 0.0051).

Cabe destacar que los valores obtenidos en drenaje quirúrgico alcanzan significación estadística (p valor <0.001), mostrando valores superiores en el grupo control a las 6 y 24 horas desde la cirugía, y una disminución con el paso del

tiempo en ambos casos que no alcanza la significación estadística y que no mostraría un beneficio en la lucha contra la progresión del tumor.

5.3.3 IL1 β y TNF- α

Tanto IL1 β como TNF- α se han relacionado previamente con un estado proinflamatorio que promueve la EMT y la mayor capacidad migratoria de las células tumorales, así como la progresión del tumor vía STAT3, que conlleva la inhibición de la apoptosis de dichas células.^{125, 137} Dong et al.¹⁶⁸ observaron esta EMT a través de TNF- α en células de cáncer de mama.

A pesar de ello, son fieles representantes de la creencia actual de que la inflamación y la respuesta inmunitaria son procesos conectados, desencadenando la inducción de la respuesta inmune en diferentes momentos del desarrollo del tumor.^{104, 128-135} Destaca su papel como mediadores en la respuesta por muerte celular inmunogénica provocada por la aplicación de la radioterapia que conlleva la activación de las células dendríticas y procesamiento de antígenos derivados del tumor, la disminución de citoquinas inmunosupresoras como IL10 y la secreción de quimiocinas como CXCL10.¹⁴⁰⁻¹⁴³

Los resultados obtenidos para IL1 β en suero en el presente estudio se considera que no tienen significación clínica ya que se partía de unos valores preoperatorios dispares (p valor <0.001).

Aunque en los valores obtenidos para IL1 β en drenaje quirúrgico no se observan diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles a las 6 y 24 horas desde la cirugía (p valores 0.073 y 0.307 respectivamente), en el análisis multivariante se observa que, en el caso de las pacientes que reciben RIO, los valores se mantienen estables con el paso del tiempo, medianas de 37.2 pg/ml y 40.7 pg /ml a las 6 y 24 horas desde la cirugía respectivamente, mientras que en los controles se produce un aumento significativo de la mediana de 19.55 pg/ml a 56.7 pg/ml a las 6 y 24 horas desde la cirugía respectivamente, que alcanza la significación estadística (p valores 0.0025 y 0.0285). Por lo tanto, al aplicarse la RIO, el ascenso en los valores de IL1 β en drenaje es menor.

Sin embargo, en el caso de TNF- α se objetiva un aumento significativo de los niveles en drenaje a las 24 horas desde la cirugía (p valor 0.003), que se corroboran en el análisis multivariante, observando que mientras las pacientes que reciben la RIO experimentan un aumento significativo de TNF- α con el tiempo, en las pacientes que no la reciben, se produce una disminución (p valores 0.0150 y 0.0124 respectivamente).

En el análisis de TNF- α en suero se observa que previamente a la aplicación de la RIO no había diferencias entre los grupos y posteriormente se establecen estas diferencias (p valor 0.371 y 0.019 respectivamente). El grupo de pacientes a las que se aplica la RIO mantiene valores estables, mientras que el que no la recibe expresa una disminución de la mediana y un aumento de la variabilidad de los datos (p valor 0.0433).

5.3.4 TGF- β

Aunque para los valores obtenidos para TGF- β en suero preoperatorio hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, a diferencia de otras proteínas, las diferencias de magnitud a las 24 horas desde la cirugía consideramos que son suficientemente importantes como para no verse alteradas por estos valores iniciales, que pueden ser atribuidos a la variabilidad propia de cada paciente, ya que no se han observado diferencias estadísticas significativas entre ambos grupos.

Numerosos estudios han relacionado a TGF- β con la inducción de un estado inmunosupresor que promueve el desarrollo del tumor.^{140, 141} Nuestro estudio arroja resultados tanto en suero como en débito de drenaje quirúrgico a las 24 horas desde la cirugía significativamente mayores en las pacientes que reciben RIO (p valor <0.001), destacando que estos valores se elevan a expensas de un grupo señalado de pacientes. Estos datos pueden ser considerados negativos para la alteración de la respuesta inmunológica y se han relacionado, como se discutirá más adelante, con el desarrollo de fibrosis.

A pesar de que deben realizarse más estudios para que seamos capaces de comprender las complejas interacciones que se producen en el desarrollo del tumor, nuestros resultados están en consonancia con los previos, encontrando una respuesta biológica causada por la RIO, la cual se ha objetivado a través de la alteración de la expresión de las diferentes proteínas tanto en débito de drenaje quirúrgico como en suero.

5.4 VALORACIÓN DE FIBROSIS

La complicación más frecuente tras la cirugía conservadora del cáncer de mama asociada a RIO es la fibrosis según la mayoría de grupos, por lo que se hace mandatorio identificar marcadores que nos ayuden a predecirla.^{1, 95,185}

El grupo de Li et al.¹⁶¹, como se ha comentado previamente, estableció que valores superiores de TGF- β a 96 pg/ml en suero después de la cirugía y previo a la radioterapia tenían una sensibilidad del 76% y una especificidad del 74% para el desarrollo de fibrosis. Además, estos valores pueden ser atribuidos a la predisposición del propio individuo sin verse afectados por las células tumorales, ya que todas las pacientes presentaban estadios iniciales de cáncer de mama. A pesar de los datos, no encontraron relación de los niveles de TGF- β con la aplicación de la radioterapia. En esta misma línea, el grupo de Boothe et al.¹⁶² apoya sus resultados.

En nuestro estudio, sin embargo, hemos observado como el grupo de pacientes que reciben la RIO presentan valores de TGF- β en suero significativamente mayores que aquellas a las que solo se les sometió a cirugía conservadora del cáncer de mama, considerando que dicha alteración es consecuencia de la RIO ($p < 0.001$). Por otro lado, cabe destacar, que en 8 de las pacientes los niveles obtenidos son superiores a 1000pg/ml. Este hallazgo está en consonancia con la bibliografía, ya que nuestras pacientes presentaban estadios iniciales de cáncer de mama con tumores pequeños, por lo que podemos atribuir dicha alteración a la variabilidad genética del individuo¹⁶³, lo que haría a este grupo de pacientes especialmente susceptibles de ser elegidas para planificación del tratamiento posterior con el fin de prevenir la fibrosis.

Discusión

De la misma forma, cabe destacar que los valores objetivados de TGF- β en suero preoperatorio pueden ser atribuidos igualmente a la variabilidad genética del individuo, ya que no se han observado diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Aunque se deben realizar más estudios, consideramos que las diferencias de magnitud halladas en los resultados de TGF- β a las 24 horas desde la cirugía son suficientemente considerables como para no verse alteradas por estos valores iniciales.

En cuanto al estudio del débito de drenaje quirúrgico, en concordancia con la literatura publicada, no se han objetivado diferencias estadísticamente significativas en los niveles de TGF- β por el hecho de aplicar la RIO a las 6 horas desde la cirugía, pero del mismo modo que el grupo de Scherer et al.¹⁸⁶ se han hallado valores elevados que previamente se han relacionado con fibrosis. Sin embargo, en el presente estudio, sí que se han encontrado diferencias estadísticamente significativas cuando han pasado 24 horas desde la cirugía asociada a RIO ($p < 0.001$).

Por otra parte, según nuestro conocimiento de la bibliografía publicada, este es el primer estudio que compara los valores de TGF- β en pacientes a las que se les ha sometido a cirugía conservadora del cáncer de mama asociada a RIO o no respectivamente en muestras de suero y de débito del drenaje, objetivando diferencias entre los grupos sin que estos hallazgos se vean alterados por el tipo de muestra a las 24 horas desde la cirugía ($p 0.5881$).

Debido a los valores elevados determinados en un total de 10 pacientes en muestras de suero y débito del drenaje quirúrgico de TGF- β , se realizó una valoración clínica de las mismas según la escala SOMA/LENT para valoración de la fibrosis (tabla 14), considerada la más ampliamente utilizada por la mayoría de grupos, tras 24 meses desde la cirugía. Los resultados de dicha valoración mostraron alteraciones en grado variable en 7 de las 10 pacientes valoradas. Cabe destacar que 2 de esas pacientes habían recibido, posteriormente al tratamiento con RIO, radioterapia externa. Aunque dichos resultados deben analizarse con cautela por tratarse de hallazgos puramente descriptivos, orientan hacia un papel importante de la valoración inicial de TGF- β en la fibrosis tras la aplicación de la RIO.

Por tanto, aunque deben realizarse más estudios, valores elevados de TGF- β en las pacientes con cáncer de mama a las que se les realiza cirugía conservadora asociada a RIO pueden predecir el riesgo de fibrosis.

5.5 LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Nuestro estudio tiene varias limitaciones que deben tenerse en cuenta en la interpretación de los resultados presentados.

La principal limitación, al igual que en la mayoría de estudios publicados, principalmente los de corte experimental, es el tamaño muestral. No obstante, nuestro trabajo está en consonancia con otras series publicadas en la literatura en las que se ha propuesto comprobar la respuesta biológica de la RIO.⁸⁸⁻⁹⁴

A pesar de tratarse de un estudio prospectivo multicéntrico, ha sido un estudio no randomizado-no aleatorizado, por lo que es posible que se hayan producido ciertas limitaciones o sesgos de selección. Sin embargo, la adecuación ética al cumplimiento de los criterios establecidos para la aplicación de la RIO en la realización del estudio justifica este punto.

Por otro lado, la centralización de esta patología en Unidades de Mama de centros referencia en los que se dispone de la tecnología utilizada en la aplicación de la RIO y del equipo multidisciplinar entrenado para ello, hace que la generalización de nuestros resultados a hospitales de menor tamaño esté en cierta forma sesgada, lo que se traduce en una menor validez externa.

Otra limitación fue la pérdida de muestras en lo relativo al débito de drenaje quirúrgico que solo se pudo recoger en el 78.33% de las pacientes a las 6 horas desde la cirugía y en el 80% de las pacientes a las 24 horas desde la cirugía. Consideramos que estas proporciones obtenidas son aceptables según la naturaleza del estudio planteado, aunque suponen un punto de mejora para futuros estudios.

Por último, ha existido una limitación principalmente económica a la hora de ampliar el número de proteínas estudiadas que están involucradas en la respuesta

del sistema inmunológico tras la aplicación de la RIO, así como el número de muestras recogidas en cada paciente. Cabe destacar que otras series como la de Piotrowski et al.⁹² recogen muestras de débito de drenaje quirúrgico a las 48 horas de la cirugía, lo que conlleva mayor tiempo de evolución de la respuesta biológica.

5.6 FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

La importancia que la respuesta del sistema inmunológico tiene en el desarrollo del tumor, así como la influencia que las nuevas terapias como la RIO tienen en la misma, es objeto de estudio para la investigación actual.⁸⁸⁻⁹⁴

A pesar de las limitaciones planteadas previamente para nuestro estudio, el trabajo tiene validez y nos ha permitido alcanzar los objetivos planteados. Sin embargo, teniendo en cuenta el tamaño muestral, consideramos que el siguiente paso, para seguir comprendiendo la respuesta biológica del sistema inmunológico tras la aplicación de la RIO por nuestro grupo, debe de ser la ampliación del número de pacientes reclutadas, así como del número de proteínas estudiadas y de las muestras recogidas con diferentes tiempos de evolución desde la aplicación del tratamiento.

Además, otro punto de mejora para futuras investigaciones puede ser la aplicación de criterios de exclusión más estrictos que hagan los grupos si cabe más equiparables, eliminando a las pacientes con afectación ganglionar tras la BSGC.

Consideramos, por otro lado, que deberían plantearse más estudios en la línea de comparar la influencia que la RIO tiene en el sistema inmunológico respecto al tratamiento radioterápico convencional, y no solo como mecanismo compensatorio de la agresión quirúrgica en el momento de la cirugía.

El conocimiento de los mecanismos de respuesta del sistema inmunológico a la aplicación de la RIO en pacientes con cáncer de mama puede suponer el desarrollo de nuevas terapias que ya han demostrado sus beneficios en otras patologías. La revista *Science* denominó a la “Inmunoterapia del cáncer” como la revelación del año 2013, en reconocimiento a los avances logrados principalmente en lo relativo a la terapia del melanoma. Los tratamientos de inmunoterapia intensifican la

capacidad del sistema inmunológico para luchar contra el cáncer, estimulando sus componentes antitumorales o bloqueando mecanismos de escape del tumor. Su uso en combinación con otras terapias como la radioterapia, está mejorando los resultados y se encuentra en estudio actualmente. Además, algunas de las proteínas analizadas en el presente trabajo como TNF- α , se han evaluado como diana terapéutica para control del cáncer, coincidiendo con la comercialización de fármacos anti-TNF indicados en enfermedades inflamatorias, con resultados prometedores como la disminución de IL6, pero que precisan de más líneas de investigación en el futuro.^{97, 194, 195}

Por otra parte, el efecto que la aplicación de la RIO tiene sobre TGF- β , como marcador temprano del desarrollo de fibrosis, precisa de la realización de más estudios al respecto que nos hagan comprender sus mecanismos de acción para contrarrestar el efecto profibrótico sin comprometer el control tumoral. La inhibición de TGF- β después de la cirugía a nivel local puede ser una opción viable como ya se ha demostrado en la cirugía del glaucoma utilizando el anticuerpo lerdelimumab mediante inyección subconjuntival después de la cirugía.¹⁸⁸

6. Conclusiones

6. CONCLUSIONES

1. La radioterapia intraoperatoria modifica la respuesta biológica en pacientes con cancer de mama. Las alteraciones del sistema inmunológico se manifiestan tanto en suero como en débito del drenaje quirúrgico a las 6 y 24 horas desde la cirugía. A pesar de que se deben desarrollar más líneas de investigación, se ha objetivado en las pacientes tratadas con esta terapia una disminución significativa de IL6 e IL8, así como un aumento de CXCL10 favorable para la lucha contra la progresión del tumor.
2. La complicación más frecuente de la radioterapia intraoperatoria es la fibrosis, cuyo componente regulador principal, TGF- β , podría servir como marcador temprano del riesgo de desarrollo de la misma. Se han determinado valores elevados de TGF- β en suero y débito del drenaje quirúrgico a las 24 horas desde la cirugía de las pacientes tratadas con radioterapia intraoperatoria significativamente superiores a aquellas que no la recibieron. Estas diferencias no se modifican independientemente del tipo de muestra que se utilice, suero o débito del drenaje quirúrgico.

7. Bibliografía

7. **BIBLIOGRAFÍA**

1. Casamayor C, Ibañez R, et al. Radioterapia intraoperatoria en cáncer de mama. 1ª ed. Zaragoza: Los Fueros Artes Gráficas; 2016.
2. Global Health Estimates 2015: Disease burden by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2015. Geneva, World Health Organization; 2016.
3. Coleman M, Alexe DM, Albrecht T, Mckee M. Responding to the Challenge of Cancer in Europe. Ljubljana, Slovenia: Institute of Public Health; 2008.
4. Sociedad Española de Oncología Médica. Las cifras del cáncer en España [Internet]. 2017. Disponible en: <http://www.seom.org>
5. Instituto Nacional de Estadística. España en cifras [Internet]. 2016. Disponible en: http://www.ine.es/prodyser/esp_cifras
6. Galceran J, Ameijide A, Carulla M, Mateos A, Quirós JR, Rojas D et al. Cancer incidence in Spain, 2015. Clin Transl Oncol. 2017; 19(7): 799-825.
7. Haward R. Organizing a comprehensive framework for cancer control. In: Coleman M, Alexe DM, Albrecht T, Mckee M, editors. Responding to the Challenge of Cancer in Europe. Ljubljana, Slovenia: Institute of Public Health; 2008. p. 113-133.
8. Borràs JM, Colomer C, Soria P, López R. Priorities for cancer control in Spain. Ann Oncol. 2010;21 Suppl 3:iii111-114.
9. Vinagre Martínez LM. Anatomía quirúrgica de la mama. En: Sierra García A, Piñero Madrona A, Illana Moreno J. Cirugía de la mama. Guías clínicas de la Asociación Española de Cirujanos. Madrid: Aran Ediciones; 2006. p. 28-37.
10. Rouvière H, Delmas A. Anatomía humana descriptiva, topográfica y funcional. 11ª ed. Barcelona: Masson; 2005.
11. Hunt KK, Green MC, Buchholz TA. Enfermedades de la mama. En: Townsend CM. Sabiston Tratado de Cirugía. Fundamentos biológicos de la práctica quirúrgica moderna. 19ª ed. Barcelona: Elsevier; 2013. p.824-69.
12. Kaminska M, Ciszewski T, Lopacka-Szatan K, Miotla P, Staroslawska E. Breast cancer risk factors. Prz

- Menopauzalny. 2015; 14 (3):196-202.
- 13.Nelson HD, Tyne K, Naik A, et al. Screening for breast cancer: An update for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med.* 2009; 151:727-737.
- 14.Berg WA, Blume JD, Cormack JB, et al. Combined screening with ultrasound and mammography vs mammography alone in women at elevated risk of breast cancer. *JAMA.* 2008; 299:2151-63.
- 15.Turnbull L, Brown S, Harvey I, et al. Comparative effectiveness of MRI in breast cancer (COMICE) trial: A randomised controlled trial. *Lancet.* 2010; 375:563-71.
- 16.Murphy JO, Moo TA, King TA, et al. Radioactive seed localization compared to wire localization in breast-conserving surgery: Initial 6-month experience. *Ann Surg Oncol.* 2013; 20:4121-27.
- 17.Rosen PR. Rosen's breast pathology. 2^{ed}. Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins; 2001.
- 18.Hartmann LC, Sellers TA, Frost MH, et al. Benign breast disease and the risk of breast cancer. *N Engl J Med.* 2005; 353:229-37.
- 19.London SJ, Connolly JL, Schnitt SJ, et al. A prospective study of benign breast disease and the risk of breast cancer. *JAMA.* 1992; 267:1780.
- 20.Dupont WD, Parl FF, Hartmann WH, et al. Breast cancer risk associated with proliferative breast disease and atypical hyperplasia. *Cancer.* 1993; 71:1258.
- 21.Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: Principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA.* 2002; 288:321-33.
- 22.Stefanick ML, Anderson GL, Margolis KL, et al. Effects of conjugated equine estrogens on breast cancer and mammography screening in postmenopausal women with hysterectomy. *JAMA.* 2006; 295: 1647-57.
- 23.Boyd NF. Mammographic density and the risk and detection of breast cancer. *N Engl J Med.* 2007; 356:227-36.
- 24.Coughlin SS, Smith SA. The impact of the natural, social,

- built and policy environments on breast cancer. *J Environ Health Sci.* 2015; 1(3):1-7.
- 25.Podkowa N, Komasińska P, Roszak M, Gryczka R, Grodecka-Gazdecka S, Lacka K. Health behaviours among women diagnosed with breast tumours. *Pol Merkur Lekarski.* 2014; 37(219):153-158.
- 26.Howell A, Anderson AS, Clarke RB, Duffy SW, Evans DG, García Closas M, et al. Risk determination and prevention of breast cancer. *Breast Cancer Research.* 2014; 16(5):1-19.
- 27.Orecchioni S, Reggiani F, Talarico G, Bertolini F. Mechanisms of obesity in the development of breast cancer. *Discov Med.* 2015; 20(109):121-128.
- 28.Allott EH, Hursting SD. Obesity and cancer: mechanistic insights from transdisciplinary studies. *Endocr Relat Cancer.* 2015; 22 (6):365-386.
- 29.Liu Y, Nguyen N, Colditz GA. Links between alcohol consumption and breast cancer: a look at the evidence. *Womens Health* 2015; 11(1):65-77.
- 30.Castro GD, Castro JA. Alcohol drinking and mammary cancer: pathogenesis and potential dietary preventive alternatives. *World J Clin Oncol.* 2014; 5(4):713-729.
- 31.Bonnie NJ. Clinical features, diagnosis, and staging of newly diagnosed breast cancer. Post TW, ed. *UpToDate.* Waltham, MA: UpToDate Inc. [actualizado Ago 2019]. Disponible en: <https://www.uptodate.com>.
- 32.Hunt KK, Mittendorf EA. Enfermedades de la mama. En: Courtney M., Townsend Jr., Beauchamp R.D., Evers B.M., Mattox K.L. Sabiston. *Tratado de cirugía. Fundamentos biológicos de la práctica quirúrgica moderna.* 20.^a ed. Barcelona: Elsevier; 2018. 820-64.
- 33.Del Cura JL, Pedraza S, Gayete A. *Radiología Esencial.* 1.^a ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2010.
- 34.Alkabban FM, Ferguson T. *Cancer, Breast.* StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; [consultado Feb 2018].
- 35.Homer MJ. *Mammographic interpretation: a practical approach.* New York, NY: McGraw-Hill; 1991. 4-5.
- 36.Esserman LJ, Shieh Y, Rutgers EJ, et al. Impact of

- mammographic screening on the detection of good and poor prognosis breast cancers. *Breast Cancer Res Treat.* 2011; 130: 725.
37. Camacho-Piedra C., Espíndola-Zarazúa V. Actualización de la nomenclatura BI-RADS®. *Anales de Radiología México.* 2018; 17:100-8.
38. Martín Díez F. Controversies in breast sonography. *Radiologia.* 2010 Jun; 52 Suppl 1:22-25.
39. Stavros AT, Thickman D, Rapp CL, et al. Solid breast nodules: use of sonography to distinguish between benign and malignant lesions. *Radiology.* 1995; 196: 123.
40. Yang WT, Ahuja A, Tang A, Suen M, King W, Metreweli C. High resolution sonographic detection of axillary lymph node metastases in breast cancer. *J Ultrasound Med.* 1996 Mar; 15(3):241-246.
41. Orel SG, Schnall MD. MR imaging of the breast for the detection, diagnosis, and staging of breast cancer. *Radiology.* 2001; Jul; 220(1):13-30.
42. Macura KJ, Ouwerkerk R, Jacobs MA, Bluemke DA. Patterns of enhancement on breast MR images: interpretation and imaging pitfalls. *Radiographics.* 2006; 26: 1719.
43. ACR Practice parameter for the performance of contrast enhanced magnetic resonance imaging (MRI) of the breast. Amended 2014 (Resolution 39)
44. Moon M, Cornfeld D, Weinreb J. Dynamic Contrast-Enhanced Breast MR imaging. *Magn Reson Imaging Clin N Am.* 2009; 17: 351-362.
45. Camps Herrero J. Resonancia magnética de mama: estado actual y aplicación clínica. *Radiología.* 2011; 53: 27-38.
46. Oncoguía SEGO: Cáncer infiltrante de mama. Guías de práctica clínica en cáncer ginecológico y mamario. Publicaciones SEGO; 2017.
47. Fitzgibbons PL, Connolly JL, Edgerton M, Simpson R. Protocol for the Examination of Biopsy Specimens From Patients With Invasive Carcinoma of the Breast. College of American Pathologists (CAP). [actualizado 2019]. Disponible en: www.cap.org/cancerprotocols.
48. Bur ME, Zimarowski MJ, Schnitt SJ, et al. Estrogen

- receptor immunohistochemistry in carcinoma in situ of the breast. *Cancer*. 1992; 69:1174.
49. Meyer JS. Cell kinetics of histologic variants of in situ breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat*. 1986; 7:171.
50. Killeen JL, Namiki H. DNA analysis of ductal carcinoma in situ of the breast. A comparison with histologic features. *Cancer*. 1991; 68:2602.
51. Bleiweiss IJ. Pathology of breast cancer. Post TW, ed. *UpToDate*. Waltham, MA: UpToDate Inc. [actualizado Dic 2019]. Disponible en: <https://www.uptodate.com>.
52. Simpson JF, Gray R, Dressler LG, et al. Prognostic value of histologic grade and proliferative activity in axillary node-positive breast cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Companion Study, EST 4189. *J Clin Oncol*. 2000; 18 (10): 2059-69.
53. Rakha EA, Lee AH, Evans AJ, et al. Tubular carcinoma of the breast: further evidence to support its excellent prognosis. *J Clin Oncol*. 2010; 28 (1): 99-104.
54. Cruz-Beníteza L, Morales-Hernández E. Historia y estado actual sobre los tipos de procedimientos quirúrgicos realizados en cáncer de mama. *Gaceta Mexicana de Oncología*. 2014; 13(2):124-133
55. Ayala de la Peña F, Andrés R, García-Saénz JA, Manso L, Margelí M, Dalmau E, et al. SEOM clinical guidelines in early stage breast cancer (2018). *Clinical and Translational Oncology* (2019) 21:18–30.
56. Clough KB, Lewis JS, Couturaud B, et al. Oncoplastic techniques allow extensive resections for breast-conserving therapy of breast carcinomas. *Ann Surg*. 2003; 237:26-34.
57. Chagpar AB, Killelea BK, Tsangaris T et al. A randomized, controlled trial of cavity shave margins in breast cancer. *N Eng J Med*. 2015; 373: 503-510.
58. Angarita FA, Nadler A, Zerhouni S, et al. Perioperative measures to optimize margin clearance in breast conserving surgery. *Surgical Oncology*. 2014; 23(2): 81–91.
59. Morrow M, Van Zee KJ, Solin LJ, Houssami N, Chavez-MacGregor M, Harris JR, et al. *Society of Surgical*

- Oncology-American Society for Radiation Oncology- American Society of Clinical Oncology Consensus Guideline on Margins for Breast-Conserving Surgery with Whole-Breast Irradiation in Ductal Carcinoma In Situ. *Ann Surg Oncol*. 2016 Nov; 23(12):3801-10.
60. Giuliano AE, Kirgan DM, Guenther JM, Morton DL. Lymphatic Mapping and Sentinel Lymphadenectomy for Breast Cancer. *Ann Surg*. 1994; 220(3): 391-401.
61. Bernet L, Piñero A, Vidal-Sicart S, Peg V, Giménez J, Algara M, et al. Consenso sobre la biopsia selectiva del ganglio centinela en el cáncer de mama. Revisión 2013 de la Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria. *Rev Senol Patol Mamar*. 2014; 27(1):43-53.
62. Acea Nebril B, García Novoa A, Cereijo Garea C, Rey Villar R, Santiago Freijanes P, Calvo Martínez L, et al. Repercusión de los criterios ACOSOG Z0011 sobre la indicación de la linfadenectomía axilar y el control locorregional en mujeres con ganglio centinela metastásico. Resultados preliminares tras cuatro años de aplicación clínica. *Rev Senol Patol Mamar*. 2015; 28(3):105-112.
63. Karakatsanis A, Christiansen PM, Fisher L, et al. The Nordic SentiMag trial: a comparison of superparamagnetic iron oxid (SPIO) nanoparticles versus Tc99 and patent blue in the detection of sentinel node in patients with breast cancer and a meta-analysis of earlier studies. *Breast Cancer Res Treat* 2016; 157: 281-294.
64. Teshome M, Wei C, Hunt KK, et al. Use of a magnetic tracer for sentinel lymph node detection in early-stage breast cancer patients: a meta-analysis. *Ann Surg Oncol* 2016; 23:1508-1514.
65. Protocolo de cáncer de mama. Unidad de Patología Mamaria del Hospital Universitario Ramón y Cajal. 2013.
66. Lyman GH, Temin S, Edge SB et al. Sentinel lymph node biopsy for patients with early -stage breast cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol* 2014; 32: 1365-1383.
67. Fitzgibbons PL, Connolly JL, Bose S, Chen YY, De Baca ME, Edgerton M, et al. Protocol for the Examination of Resection Specimens From Patients With Invasive Carcinoma of the Breast. College of American Pathologists (CAP).

- [actualizado 2019]. Disponible en: www.cap.org/cancerprotocols.
68. Muñoz-Garzón VM, Panades G. 100 años de radioterapia. *Med Balear*. 1995; 10 (3): 130-138.
69. Rodríguez A. Radioterapia en el cáncer de mama [Internet]. Disponible en: www.seom.org
70. Vaidya JS, Joseph DJ, Tobias JS, Bulsara M, Wenz F, Saunders C, et al. Targeted intraoperative radiotherapy versus whole breast radiotherapy for breast cancer (TARGIT-A trial): An international, prospective, randomised, non-inferiority phase 3 trial. *Lancet*. 2010; 376(9735):91-102.
71. Veronesi U, Orecchia R, Maisonneuve P, Viale G, Rotmensz N, Sangalli C, et al. Intraoperative radiotherapy versus external radiotherapy for early breast cancer (ELIOT): a randomised controlled equivalence trial. *Lancet Oncol*. 2013; 14: 1269-77.
72. Günay S, Alan Ö, Yalçın O, Türkmen A, Dizdar N. Our intraoperative boost radiotherapy experience and applications. *Ulus Cerrahi Derg*. 2015; 32(1):30-6.
73. Vaidya J, Tobias J, Baum M, Keshtgar M, Joseph D, Hilaris B, et al. Intraoperative radiotherapy for breast cancer. *The Lancet. Oncology* (serial of the internet). 2004; 5(3): 165-173.
74. Cantero-Muñoz P, Atienza-Merino G. Radioterapia intraoperatoria en el tratamiento del cáncer de mama. Red Española de Agencias de Evaluación de Tecnologías y Prestaciones del SNS. Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Galicia. Informes de evaluación de tecnologías sanitarias.
75. Sperk E, Welzel G, Keller A, Kraus-Tiefenbacher U, Gerhardt A, Sutterlin M, et al. Late radiation toxicity after intraoperative radiotherapy (IORT) for breast cancer: results from the randomized phase III trial TARGIT A. *Breast Cancer Res Treat*. 2012; 135 (1): 253-60.
76. Darby S, McGale P, Correa C, Taylor C, Arriaga R, Clarke M, et al. Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: metaanalysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials. *Lancet*. 2011; 378:1707-16.

77. Wenz F, Blank E, Welzel G, Hofmann F, Astor D, Neumaier C, et al. Intraoperative radiotherapy during breast-conserving surgery using a miniature X-ray generator (Intabeam): theoretical and experimental background and clinical experience. *Women's Health (Lond Engl)*. 2012; 8:39-47.
78. Vaidya JS, Wenz F, Bulsara M, Tobias JS, Joseph DJ, Keshtgar M, et al. On behalf of the TARGIT trialists' group: Risk adapted intraoperative radiotherapy versus whole-breast radiotherapy for breast cancer: 5-year results for local control and overall survival from the TARGIT-A randomised trial. *Lancet*. 2014; 383: 603-13.
79. Whelan TJ, Pignol JP, Levine MN, Julian JA, MacKenzie R, Parpia S, et al. Long-term results of hypofractionated radiation therapy for breast cancer. *N Engl J Med*. 2010; 362: 513-20.
80. Sole CV, Calvo FA, Ferrer C, Pascau J, Marsiglia H. Bibliometrics of intraoperative radiotherapy. Analysis of technology, practise and publication tendencies. *Strahlenther Onkol*. 2014; 190: 1111-16.
81. Rodríguez N, Murillo MT, González E, De la Fuente C, Moreno F. Irradiación parcial acelerada en cáncer de mama: revisión de las diferentes técnicas. *Rev Senol Patol Mamar*. 2014; 27(1):34-42.
82. Tom MC, Joshi N, Vicini F, Chang AJ, Hong TS, Showalter TN, et al. The American Brachytherapy Society consensus statement on intraoperative radiation therapy. *Brachytherapy*. 2019; 18: 242-57.
83. Valente SA, Tendulkar RD, Cherian S. TARGIT-R (Retrospective): North American experience with intraoperative radiation using low-kilovoltage x-rays for breast cancer. *Ann Surg Oncol*. 2016; 23(9) 2809-15.
84. Vaidya JS, Bulsara M, and Wenz F. Reduced mortality with partial-breast irradiation for early breast cancer: a meta-analysis of randomized trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2016; 96(2) 259-265.
85. Esposito E, Douek M. Update on intraoperative radiotherapy: new challenges and issues. *ecancer* 2018, 12:793.
86. Silverstein MJ, Fastner G, Maluta S, Reitsamer R, Goer

- DA, Vicini F. Intraoperative Radiation Therapy: A Critical Analysis of the ELIOT and TARGIT Trials. Part 1—ELIOT. *Ann Surg Oncol*. 2014; 21:3787–92.
87. Silverstein MJ, Fastner G, Maluta S, Reitsamer R, Goer DA, Vicini F. Intraoperative Radiation Therapy: A Critical Analysis of the ELIOT and TARGIT Trials. Part 2—TARGIT. *Ann Surg Oncol*. 2014; 21:3793–99.
88. Belletti B, Vaidya J, D'Andrea S, Entschladen F, Roncandin M, Lovat F, et al. Targeted intraoperative radiotherapy impairs the stimulation of breast cancer cell proliferation and invasion caused by surgical wounding. *Clin Cancer Res*. 2008; 14(5): 1325-32.
89. Zaleska K, Suchorska W, Przybyla A, Murawa D. Effect of surgical wound fluids after intraoperative electron radiotherapy on the cancer stem cell phenotype in a panel of human breast cancer cell lines. *Oncotherapy Letter*. 2016; 12: 3707-14.
90. Zaleska K, Przybyla A, Kulcenty K, Wichtowski M, Mackiewicz A, Suchorska W. Wound fluids affect miR-21, miR-155 and miR-221 expression in breast cancer cell lines, and this effect is partially abrogated by intraoperative radiation therapy treatment. *Oncology Letters*. 2017; 14: 4029-36.
91. Piotrowski I, Kulcenty K, Wichtowski M, Murawa D, Suchorska W. Intraoperative radiotherapy of breast cancer and its biological effects. *Breast Care*. 2017; 12: 109-13.
92. Piotrowski I, Kulcenty K, Murawa D, Suchorska W. Surgical wound fluids from patients treated with intraoperative radiotherapy induce radiobiological response in breast cancer cells. *Medical Oncology*. 2019; 36: 14
93. Kulcenty K, Piotrowski I, Zaleska K, Wichtowski M, Wróblewska J, Murawa D, et al. Wound fluids collected postoperatively from patients with breast cancer induce epithelial to mesenchymal transition but intraoperative radiotherapy impairs this effect by activating the radiation-induced bystander effect. *Scientific Reports*. 2019; 9: 7891.
94. Kulcenty K, Piotrowski I, Rucinske M, Wroblewska JP, Jopek K, Murawa D, et al. Surgical Wound Fluids from Patients with Breast Cancer Reveal Similarities in the

- Biological Response Induced by Intraoperative Radiation Therapy and the Radiation-Induced Bystander Effect—Transcriptomic Approach. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21: 1159.
95. Ruano-Ravina A, Cantero-Muñoz P, Eraso-Urién A. Efficacy and safety of intraoperative radiotherapy in breast cancer: A systematic review. *Cancer Letters.* 2011; 313(1): 15–25.
96. Toche P. Visión panorámica del sistema inmune. *Rev. Med. Clin Condes.* 2012; 23(4): 446-57.
97. Red de Inmunoterapia del Cáncer. Inmunoterapia frente al cáncer: utilización del Sistema Inmunológico para combatir el cáncer. 1ª ed. Navarra: Eunsa; 2017.
98. Zipfel PF. Complement and immune defense: from innate immunity to human diseases. *Immunol Lett.* 2009; 126(1-2):1-7.
99. Kunkel EJ, Butcher EC. Chemokines and the tissue-specific migration of lymphocytes. *Immunity.* 2002; 16(1):1-4.
100. Jäger A, Kuchroo VK. Effector and regulatory T-cell subsets in autoimmunity and tissue inflammation. *Scand J Immunol.* 2010; 72(3):173-84.
101. Tsou P, Katayama H, Ostrin EJ, Hanash SM. The Emerging Role of B Cells in Tumor Immunity. *Cancer research.* 2016; 76(19):5597-5601.
102. Fremd C, Schuetz F, Sohn C, Beckhove P, Domschke C. B cell-regulated immune responses in tumor models and cancer patients. *Oncoimmunology.* 2013; 2(7): e25443.
103. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: Integrating IMMUNITY's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science.* 2011; 331: 1565-70.
104. Gajewski TF, Schreiber H, Fu Y. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol.* 2013; 14(10): 1014-22.
105. Zou W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer.* 2005; 5(4): 263-74.
106. Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in

- human tumours. *Immunol Today*. 1997; 18: 89-95.
107. Garrido F, Algarra I. MHC antigens and tumor escape from immune surveillance. *Adv Cancer Res*. 2011; 83: 117-158.
108. Garrido F, Cabrera T, Aptsiauri N. "Hard" and "soft" lesions underlying the HLA class I alterations in cancer cells: implications for immunotherapy. *Int J Cancer*. 2010; 127: 249-56.
109. Okazaki T, Honjo T. The PD-1/PDL-1 pathway in immunological tolerance *TRENDS in IMMUNOLOGY*. 2006; 27: 195-201.
110. Chappell DB, Restifo NP. T cell-tumor cell: a fatal interaction? *Cancer Immunol Immunother*. 1998;47(2):65-71.
111. Liu FT. Galectins: a new family of regulators of inflammation. *Clin Immunol*. 2000; 97: 79-88.
112. Wu AA, Drake V, Huang HS, Chiu S, Zheng L. Reprogramming the tumor microenvironment: tumor-induced immunosuppressive factors paralyze T cells. *Oncoimmunology*. 2015;4(7):e1016700.
113. Rose DM, Grabovsky V, Alon R, Ginsberg MH. The affinity of integrin $\alpha(4)\beta(1)$ governs lymphocyte migration. *J Immunol*. 2001;167(5):2824-30.
114. Jaiswal S, Jamieson CH, Pang WW, Park CY, Chao MP, Majeti R, et al. CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis. *Cell*. 2009;138(2):271-85.
115. Quail FD, Joyce AJ. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med*. 2013; 19, 1423-37.
116. Kerkar SP, Restifo NP. Cellular constituents of immune escape within the tumor microenvironment. *Cancer Res*. 2012;72(13):3125-30.
117. Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB, Lewis CE. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(8):618-31.
118. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol*. 2010; 11:889-96.

- 119.Goswami S, Sahai E, Wyckoff JB, Cammer M, Cox D, Pixley FJ, et al. Macrophages Promote the Invasion of Breast Carcinoma Cells via a Colony-Stimulating Factor-1/Epidermal Growth Factor Paracrine Loop. *Cancer Res.* 2005; 65 (12): 5278-83.
- 120.Coniglio SJ, Eugenin E, Dobrenis K, Stanley ER, West BL, Symons MH, et al. Microglial stimulation of glioblastoma invasion involves epidermal growth factor receptor (EGFR) and colony stimulating factor 1 receptor (CSF-1R) signaling. *Mol Med.* 2012;18:519-27.
- 121.Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(4):253-68.
- 122.Guiducci C, Vicari AP, Sangaletti S, Trinchieri G, Colombo MP. Redirecting in vivo elicited tumor infiltrating macrophages and dendritic cells towards tumor rejection. *Cancer Res.* 2005;65(8):3437-46.
- 123.Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 2006; 6: 392-401.
- 124.Kraman M, et al. Suppression of antitumor immunity by stromal cells expressing fibroblast activation protein-alpha. *Science.* 2010;330: 827-30.
- 125.Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell.* 2009;139(5):871-90.
- 126.Rebouissou S1, Amessou M, Couchy G, Poussin K, Imbeaud S, Pilati C, et al. Frequent in-frame somatic deletions activate gp130 in inflammatory hepatocellular tumours. *Nature.* 2009;457(7226):200-4.
- 127.Naugler WE, Sakurai T, Kim S, Maeda S, Kim K, Elsharkawy AM, et al. Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. *Science.* 2007;317(5834):121-4.
- 128.Rakoff-Nahoum S, Medzhitov R. Regulation of spontaneous intestinal tumorigenesis through the adaptor protein MyD88. *Science.* 2007;317(5834):124-7.
- 129.Swann JB, Vesely MD, Silva A, Sharkey J, Akira S, Schreiber RD, et al. Demonstration of inflammation-induced cancer

- and cancer immunoediting during primary tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci.* 2008;105(2):652-6.
130. Krelín Y, Voronov E, Dotan S, Elkabets M, Reich E, Fogel M, et al. Interleukin-1 β -driven inflammation promotes the development and invasiveness of chemical carcinogen-induced tumors. *Cancer Res.* 2007;67(3):1062-71.
131. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med.* 2007;13(9):1050-9.
132. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini JL, et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med.* 2007;13(1):54-61.
133. Ghiringhelli F, Apetoh L, Tesniere A, Aymeric L, Ma Y, Ortiz C, et al. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1 β -dependent adaptive immunity against tumors. *Nat Med.* 2009;15(10):1170-8.
134. Cordero JB, Cagan RL. Canonical wingless signaling regulates cone cell specification in the *Drosophila* retina. *Dev Dyn.* 2010;239(3):875-84.
135. Triner D, Shah YM. Hypoxia-inducible factors: a central link between inflammation and cancer. *J Clin Invest.* 2016; 126:3689-98.
136. Bindea G, Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Waldner M, Obenauf AC, et al. Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer. *Immunity.* 2013;39(4):782-95.
137. Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell.* 2003;114(2):181-90.
138. Slaney CY. Trafficking of T cells into tumors. *Cancer Res.* 2014; 74: 7168-74.
139. Demaria S, Coleman CN, Formenti S. Radiotherapy: changing the game in immunotherapy. *Trends Cancer.* 2016;2(6):286-94.
140. Barker HE, Paget JTE, Khan A, Harrington KJ. The tumour microenvironment after

- radiotherapy: mechanisms of resistance and recurrence. *Nat Rev Cancer*. 2015; 15 (7): 409-25.
141. Boustani J, Grapin M, Laurent PA, Apetoh L, Mirjole C. The 6th R of radiobiology: reactivation of anti-tumor immune response. *Cancers*. 2019; 11(6). pii: E860.
142. Golden EB, Apetoh L. Radiotherapy and immunogenic cell death. *Semin Radiat Oncol*. 2015;25(1):11-7.
143. Lippitz BE, Harris RA. A translational concept of immuno-radiobiology. *Radiother Oncol*. 2019;140:116-24.
144. Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. Immunogenic cell death in radiation therapy. *Oncoimmunology*. 2013;2(10):e26536.
145. Kaminski JM, Shinohara E, Summers JB, Niermann KJ, Morimoto A, Brousal J. The controversial abscopal effect. *Cancer Treat Rev* 2005; 31:159-72.
146. Kroemer G, Zitvogel L. Abscopal but desirable: The contribution of immune responses to the efficacy of radiotherapy. *Oncoimmunology* 2012; 1:407-8.
147. Lerret NM, Marzo AL. Adoptive T-cell transfer combined with a single low dose of total body irradiation eradicates breast tumors. *Oncoimmunology* 2013; 2:e22731.
148. Postow MA, Barker CA, Yamada Y, Yuan J, Kitano S. Immunologic correlates of the abscopal effect in a patient with melanoma. *N Engl J Med*. 2012; 366(10): 925-31.
149. Xu J, Escamilla J, Mok S, David J, Priceman S, West B, et al. CSF1R signaling blockade stanches tumor-infiltrating myeloid cells and improves the efficacy of radiotherapy in prostate cancer. *Cancer Res*. 2013; 73: 2782–94.
150. Tsai CS, Chen FH, Wang CC, Huang HL, Jung SM, Wu CJ, et al. Macrophages from irradiated tumors express higher levels of iNOS, arginase-I and COX-2, and promote tumor growth. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2007; 68: 499–507.
151. Chiang CS, Fu SY, Wang SC, Yu CF, Chen FH, Lin CM, et al. Irradiation promotes an M2 macrophage phenotype in

- tumor hypoxia. *Front Oncol.* 2012; 2: 89.
- 152.Schaue D, Xie MW, Ratican JA, McBride WH. Regulatory T cells in radiotherapeutic responses. *Front Oncol.* 2012; 2: 90.
- 153.Filatenkov A, Baker J, Strober S. Disruption of evasive immune cell microenvironment in tumors reflects immunity induced by radiation therapy. *OncoImmunology* 2016;5(2):e1072673.
- 154.Lee Y, Auh SL, Wang Y, Burnette B, Wang Y, Meng Y, et al. Therapeutic effects of ablative radiation on local tumor require CD8+ T cells: changing strategies for cancer treatment. *Blood.* 2009; 114: 589-95.
- 155.Pohlert D, Brenmoehl J, Löffler I, Müller CK, Leipner C, Schultze-Mosgau S, et al. TGF- β and fibrosis in different organs-molecular pathway imprints. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2009; 1792(8): 746-756.
- 156.Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med.* 2012; 18(7):1028-40.
- 157.Vujaskovic Z. Using biological markers to predict risk of radiation injury. *Semin Radiat Oncol.* 2007 Apr; 17(2):89-98.
- 158.Bentzen SM. Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: Radiobiology meets molecular pathology. *Nat Rev Cancer.* 2006; 6:702-713.
- 159.Martin M, Lefaix J, Delanian S. TGF-beta1 and radiation fibrosis:A master switch and a specific therapeutic target? *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2000; 47:277-290.
- 160.Anscher MS. Targeting the TGF-beta1 pathway to prevent normal tissue injury after cancer therapy. *Oncologist.* 2010; 15(4):350-9.
- 161.Li C, Wilson PB, Levine E, Barber J, Stewart AL, Kumar S. TGF-beta1 levels in pre-treatment plasma identify breast cancer patients at risk of developing post-radiotherapy fibrosis. *Int J Cancer.* 1999 Apr 20; 84(2):155-159.
- 162.Boothe DL, Coplowitz S, Greenwood E, Christos PJ, Parashar B, Nori D, et al. Transforming Growth Factor Beta-1 (TGF- β 1) is a Serum Biomarker of Radiation Induced Fibrosis in Patients

- Treated with Intracavitary Accelerated Partial Breast Irradiation (IBAPBI): Preliminary Results of a Prospective Study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2013 December 1; 87(5): 1030–1036.
163. McGale P, Taylor C, Correa C, Cutter D, Duane F, et al. Effect of radiotherapy after mastectomy and axillary surgery on 10-year recurrence and 20-year breast cancer mortality: metaanalysis of individual patient data for 8135 women in 22 randomised trials. *Lancet.* 2014; 383: 2127–35.
164. Demicheli R, Valagussa P, Bonadonna G. Does surgery modify growth kinetics of breast cancer micrometastases? *Br J Cancer.* 2001;85:490–2.
165. Fisher B, Gunduz N, Coyle J, Rudock C, Saffer E. Presence of a growth-stimulating factor in serum following primary tumor removal in mice. *Cancer Res.* 1989;49:1996 ^ 2001.
166. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* 1889;1:571^3.
167. Krall JA, Reinhardt F, Mercury OA, Pattabiraman DR, Brooks MW, Dougan M, et al. The systemic response to surgery triggers the outgrowth of distant immune-controlled tumors in mouse models of dormancy. *Sci Transl Med.* 2018;10(436).
168. Dong R, Wang Q, He XL, Chu YK, Lu JG, Ma QJ. Role of nuclear factor kappa B and reactive oxygen species in the tumor necrosis factor-alpha-induced epithelial-mesenchymal transition of MCF-7 cells. *Braz J Med Biol Res.* 2007; 40(8): 1071-8.
169. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100(7): 3983-8.
170. Santisteban M, Reiman JM, Asiedu MK, Behrens MD, Nassar A, Kalli KR, et al. Immune-induced epithelial to mesenchymal transition in vivo generates breast cancer stem cells. *Cancer Res.* 2009;69(7):2887-95.
171. Segatto I, Berton S, Sonogo M, Massarut S, D'Andrea S, Perin T, et al. Inhibition of breast cancer local relapse by targeting p70S6 kinase

- activity. *J Mol Cell Biol.* 2013; 5(6): 428-31.
- 172.Vaidya JS, Baum M, Tobias JS, Massarut S, Wenz F, Murphy O, et al. Targeted intraoperative radiotherapy (TARGIT) yields very low recurrence rates when given as a boost. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006; 66:1335–8.
- 173.Sedlmayer, F. et al. Boost IORT in Breast Cancer: Body of Evidence. *International journal of breast cancer* 2014.
- 174.Wang, X., Liu, J., Wang, W., Feng, Q. & Wang, X. Clinical analysis of intraoperative radiotherapy during breast-conserving surgery of early breast cancer in the Chinese Han population. *Oncotarget* 6, 43120–43126, (2015).
- 175.Rostami A, Toossi MT, Sazgarnia A, Soleymanifard S. The effect of glucose-coated gold nanoparticles on radiation bystander effect induced in MCF-7 and QUBB cell lines. *Radiat Environ Biophys.* 2016; 55:461–6.
- 176.Hu B, Han W, Wu L, Feng H, Liu X, Zhang L, et al. In situ visualization of DSBs to assess the extranuclear/extracellular effects induced by low-dose alpha-particle irradiation. *Radiat Res.* 2005;164:286–91.
- 177.Chen S, Zhao Y, Zhao G, Han W, Bao L, Yu KN, et al. Up-regulation of ROS by mitochondria-dependent bystander signaling contributes to genotoxicity of bystander effects. *Mutat Res.* 2009;666:68–73.
- 178.Tsai KK, Chuang EY, Little JB, Yuan ZM. Cellular mechanisms for low-dose ionizing radiation-induced perturbation of the breast tissue microenvironment. *Cancer Res.* 2005; 65(15):6734-44.
- 179.Veronesi U, Orecchia R, Luini A, Galimberti V, Gatti G, Intra M, et al. Full-dose intraoperative radiotherapy with electrons during breast-conserving surgery: experience with 590 cases. *Ann. Surg.* 2005; 242 (1): 101–106.
- 180.Key S, Miglierini P, Dupré PF, Guilbert S, Lucia AS, Abgral R, et al. Cosmetic Outcome and Chronic Breast Toxicity After Intraoperative Radiation Therapy (IORT) as a Single Modality or as a Boost Using the Intrabeam® Device: A Prospective Study. *Ann Surg Oncol.* 2017; 24(9): 2547-2555.
- 181.Mussari S, Sabino Della Sala W, Busana L, Vanoni V, Eccher

- C, Zani B, et al. Full-dose intraoperative radiotherapy with electrons in breast cancer. First report on late toxicity and cosmetic results from a single-institution experience, *Strahlenther. Onkol.* 2006; 182 (10): 589–595.
- 182.Wenz F, Welzel G, Keller A, Blank E, Vorodi F, Herskind C, et al. Early initiation of external beam radiotherapy (EBRT) may increase the risk of long-term toxicity in patients undergoing intraoperative radiotherapy (IORT) as a boost for breast cancer. *Breast.* 2008; 17 (6): 617–622.
- 183.Luini A, Orecchia R, Gatti G, Intra M, Ciocca M, Galimberti V, et al. The pilot trial on intraoperative radiotherapy with electrons (ELIOT): update on the results. *Breast Can. Res. Treat.* 2005; 93 (1): 55–59.
- 184.Boyages J, Baker L. Evolution of radiotherapy techniques in breast conservation treatment. *Gland Surg* 2018;7(6):576-595.
- 185.Allué Cabañuz M, Arribas Del Amo MD, Navarro Barlés A, Guemes Sanchez AT. Influence of radiotherapy on immediate breast reconstruction after skin-sparing mastectomy. Before or after: Does it matter? *Cir Esp.* 2019; 97(3):156-161.
- 186.Scherer SD, Bauer J, Schmaus A, Neumaier C, Herskind C, Veldwijk MR, et al. (2016) TGF- β 1 Is Present at High Levels in Wound Fluid from Breast Cancer Patients Immediately Post-Surgery, and Is Not Increased by Intraoperative Radiation Therapy (IORT). *PLoS ONE* 11(9):e0162221. doi:10.1371/journal.pone.0162221.
- 187.Akhurst RJ, Hata A. Targeting the TGFbeta signalling pathway in disease. *Nat Rev Drug Discov.* 2012; 11(10):790–811.
- 188.Mead AL, Wong TT, Cordeiro MF, Anderson IK, Khaw PT. Evaluation of anti-TGF-beta2 antibody as a new postoperative anti-scarring agent in glaucoma surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003; 44(8):3394–401.
- 189.Machin D, Campbell M, Fayers P, Pinol A. Sample size tables for clinical studies. 2nd ed. Blackwell Science; 1997.
- 190.Cohen J. Statistical Power Analysis for the Behavioural Sciences. 2nd ed. New Jersey: Lawrence Earlbaum; 1988.

- 191.Sanvisens A, Zuluaga P, Fuster D, Rivas I, Tor J, Marcos M, et al. Long-term mortality of patients with an alcohol-related Wernicke-korsakoff syndrome. *Alcohol Alcohol*. 2017; 52: 466-471.
- 192.Bilmorra KY, Bentrem DJ, Hansen NM, et al. Comparison of sentinel lymph node alone and completion axillary lymph node dissection for node-positive breast cancer. *J Clin Oncol*. 2009 Jun 20; 27(18):2946-53.
- 193.Straver ME, Meljnen P, van Tienhoven G, et al. Sentinel node identification rate and nodal involvement in the EORTC 10981-22023 AMAROS trial. *Ann Surg Oncol*. 2010 Jul; 17(7): 1854-61.
- 194.Madhusudan S, Foster M, Muthuramalingam SR, Braybrooke JP, Wilner S, Kaur K, et al. A phase II study of etanercept (Enbrel), a tumor necrosis factor alpha inhibitor in patients with metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2004; 10: 6528-34.
- 195.Carmona L. Terapias anti-TNF y neoplasias. *Reumatol Clin*. 2010;6(2):102-5.

8. Anexos

8. ANEXOS

8.1 ANEXO I: Grupo estadio pronóstico

Cuando T es...	Y N es...	Y M es...	Y G es...	Y HER2 es...	Y ER es...	Y PR es...	El grupo Estadio Pronóstico es...
Tis	N0	M0	1-3	Cualquiera	Cualquiera	Cualquiera	0
T1	N0	M0	1	Positivo	Cualquiera	Cualquiera	IA
T1	N0	M0	1-2	Negativo	Positivo	Positivo	IA
T1	N0	M0	2	Positivo	Positivo	Positivo	IA
T1	N0	M0	3	Positivo	Positivo	Cualquiera	IA
T0-1	N1mi	M0	1	Positivo	Cualquiera	Cualquiera	IA
T0-1	N1mi	M0	1-2	Negativo	Positivo	Positivo	IA
T0-1	N1mi	M0	2	Positivo	Positivo	Positivo	IA
T0-1	N1mi	M0	3	Positivo	Positivo	Cualquiera	IA
T1-2	N0	M0	1-3	Negativo	Positivo	Cualquiera	IA
T1	N0	M0	1	Negativo	Positivo	Negativo	IB
T1	N0	M0	1	Negativo	Negativo	Positivo	IB
T1	N0	M0	2	Positivo	Positivo	Negativo	IB
T1	N0	M0	2	Positivo	Negativo	Cualquiera	IB
T1	N0	M0	2	Negativo	Negativo	Positivo	IB
T1	N0	M0	3	Positivo	Negativo	Cualquiera	IB
T1	N0	M0	3	Negativo	Positivo	Positivo	IB
T0-1	N1mi	M0	1	Negativo	Positivo	Negativo	IB
T0-1	N1mi	M0	1	Negativo	Negativo	Positivo	IB
T0-1	N1mi	M0	2	Positivo	Positivo	Negativo	IB
T0-1	N1mi	M0	2	Positivo	Negativo	Cualquiera	IB
T0-1	N1mi	M0	2	Negativo	Negativo	Positivo	IB
T0-1	N1mi	M0	3	Positivo	Negativo	Cualquiera	IB
T0-1	N1mi	M0	3	Negativo	Positivo	Positivo	IB
T2	N0	M0	1-3	Positivo	Positivo	Positivo	IB
T2	N0	M0	1-2	Negativo	Positivo	Positivo	IB
T1	N1	M0	1-3	Positivo	Positivo	Positivo	IB
T1	N1	M0	1-2	Negativo	Positivo	Positivo	IB

Tabla adaptada de Hortobagyi GN, Connolly JL, D'Orsi CJ, Edge SB, Mittendorf EA, Rugo HS, et al. *Breast. In: AJCC Cancer Staging Manual [Internet]. 8th ed. Chicago: Springer International Publishing; 2017 [cited 2020 Jan 3]. p. 58*

Cuando T es...	Y N es...	Y M es...	Y G es...	Y HER2 es...	Y ER es...	Y PR es...	El grupo Estadio Pronóstico es...
T2	N1	M0	1	Negativo	Positivo	Positivo	IB
T2	N1	M0	2	Positivo	Positivo	Positivo	IB
T0-2	N2	M0	1-2	Positivo	Positivo	Positivo	IB
T3	N1-2	M0	1	Positivo	Positivo	Positivo	IB
T3	N1-2	M0	2	Positivo	Positivo	Positivo	IB
T1	N0	M0	1	Negativo	Negativo	Negativo	IIA
T1	N0	M0	2	Negativo	Negativo	Negativo	IIA
T1	N0	M0	3	Negativo	Positivo	Negativo	IIA
T1	N0	M0	3	Negativo	Negativo	Positivo	IIA
T1	N0	M0	3	Negativo	Negativo	Negativo	IIA
T0-1	N1mi	M0	1	Negativo	Negativo	Negativo	IIA
T0-1	N1mi	M0	2	Negativo	Negativo	Negativo	IIA
T0-1	N1mi	M0	3	Negativo	Positivo	Negativo	IIA
T0-1	N1mi	M0	3	Negativo	Negativo	Positivo	IIA
T0-1	N1mi	M0	3	Negativo	Negativo	Negativo	IIA
T0-1	N1	M0	1	Positivo	Positivo	Negativo	IIA
T0-1	N1	M0	1-2	Positivo	Negativo	Cualquiera	IIA
T0-1	N1	M0	1	Negativo	Positivo	Negativo	IIA
T0-1	N1	M0	1	Negativo	Negativo	Positivo	IIA
T0-1	N1	M0	3	Negativo	Positivo	Positivo	IIA
T2	N0	M0	1	Positivo	Positivo	Negativo	IIA
T2	N0	M0	1-2	Positivo	Negativo	Cualquiera	IIA
T2	N0	M0	1	Negativo	Positivo	Negativo	IIA
T2	N0	M0	1	Negativo	Negativo	Positivo	IIA
T2	N0	M0	3	Negativo	Positivo	Positivo	IIA
T0-2	N2	M0	1	Negativo	Positivo	Positivo	IIA
T3	N1-2	M0	1	Negativo	Positivo	Positivo	IIA

Tabla(continuación) adaptada de Hortobagyi GN, Connolly JL, D'Orsi CJ, Edge SB, Mittendorf EA, Rugo HS, et al. *Breast. In: AJCC Cancer Staging Manual [Internet]. 8th ed. Chicago: Springer International Publishing; 2017 [cited 2020 Jan 3]. p. 58*

Cuando T es...	Y N es...	Y M es...	Y G es...	Y HER2 es...	Y ER es...	Y PR es...	El grupo Estadio Pronóstico es...
T0-1	N1	M0	1	Negativo	Negativo	Negativo	IIB
T0-1	N1	M0	2	Positivo	Positivo	Negativo	IIB
T0-1	N1	M0	2	Negativo	Positivo	Negativo	IIB
T0-1	N1	M0	2	Negativo	Negativo	Positivo	IIB
T0-1	N1	M0	3	Positivo	Positivo	Negativo	IIB
T0-1	N1	M0	3	Positivo	Negativo	Cualquiera	IIB
T2	N0	M0	1	Negativo	Negativo	Negativo	IIB
T2	N0	M0	2	Positivo	Positivo	Negativo	IIB
T2	N0	M0	2	Negativo	Positivo	Negativo	IIB
T2	N0	M0	2	Negativo	Negativo	Positivo	IIB
T2	N0	M0	3	Positivo	Positivo	Negativo	IIB
T2	N0	M0	3	Positivo	Negativo	Cualquiera	IIB
T2	N1	M0	1	Positivo	Cualquiera	Cualquiera	IIB
T2	N1	M0	1	Negativo	Negativo	Positivo	IIB
T0-2	N2	M0	2	Negativo	Positivo	Positivo	IIB
T0-2	N2	M0	3	Positivo	Positivo	Positivo	IIB
T3	N1-2	M0	2	Negativo	Positivo	Positivo	IIB
T3	N1-2	M0	3	Positivo	Positivo	Positivo	IIB
T0-1	N1	M0	2	Negativo	Negativo	Negativo	IIIA
T0-1	N1	M0	3	Negativo	Positivo	Negativo	IIIA
T0-1	N1	M0	3	Negativo	Negativo	Cualquiera	IIIA
T2	N0	M0	2	Negativo	Negativo	Negativo	IIIA
T2	N0	M0	3	Negativo	Positivo	Negativo	IIIA
T2	N0	M0	3	Negativo	Negativo	Cualquiera	IIIA
T2	N1	M0	1	Negativo	Positivo	Negativo	IIIA
T2	N1	M0	2	Positivo	Negativo	Negativo	IIIA
T2	N1	M0	2	Negativo	Positivo	Negativo	IIIA
T2	N1	M0	3	Positivo	Positivo	Negativo	IIIA
T2	N1	M0	3	Positivo	Negativo	Negativo	IIIA

Tabla(continuación) adaptada de Hortobagyi GN, Connolly JL, D'Orsi CJ, Edge SB, Mittendorf EA, Rugo HS, et al. *Breast. In: AJCC Cancer Staging Manual [Internet]. 8th ed. Chicago: Springer International Publishing; 2017 [cited 2020 Jan 3]. p. 58*

Cuando T es...	Y N es...	Y M es...	Y G es...	Y HER2 es...	Y ER es...	Y PR es...	El grupo Estadio Pronóstico es...
T3	N0	M0	1	Negativo	Positivo	Negativo	IIIA
T3	N0	M0	2	Positivo	Negativo	Negativo	IIIA
T3	N0	M0	2	Negativo	Positivo	Negativo	IIIA
T3	N0	M0	3	Positivo	Positivo	Negativo	IIIA
T3	N0	M0	3	Positivo	Negativo	Negativo	IIIA
T0-2	N2	M0	1	Positivo	Positivo	Negativo	IIIA
T0-2	N2	M0	1	Positivo	Negativo	Cualquiera	IIIA
T0-2	N2	M0	1	Negativo	Positivo	Negativo	IIIA
T0-2	N2	M0	1	Negativo	Negativo	Positivo	IIIA
T0-2	N2	M0	2	Positivo	Positivo	Negativo	IIIA
T0-2	N2	M0	2	Positivo	Negativo	Cualquiera	IIIA
T3	N1-2	M0	1	Positivo	Positivo	Negativo	IIIA
T3	N1-2	M0	1	Positivo	Negativo	Cualquiera	IIIA
T3	N1-2	M0	1	Negativo	Positivo	Negativo	IIIA
T3	N1-2	M0	1	Negativo	Negativo	Positivo	IIIA
T3	N1-2	M0	2	Positivo	Positivo	Negativo	IIIA
T3	N1-2	M0	2	Positivo	Negativo	Cualquiera	IIIA
T4	N0-2	M0	1	Negativo	Positivo	Positivo	IIIA
Cualquiera	N3	M0	1	Negativo	Positivo	Positivo	IIIA
T2	N1	M0	1-2	Negativo	Negativo	Negativo	IIIB
T2	N1	M0	3	Negativo	Positivo	Negativo	IIIB
T3	N0	M0	1-2	Negativo	Negativo	Negativo	IIIB
T3	N0	M0	3	Negativo	Positivo	Negativo	IIIB
T0-2	N2	M0	2	Negativo	Positivo	Negativo	IIIB
T0-2	N2	M0	2	Negativo	Negativo	Positivo	IIIB
T0-2	N2	M0	3	Positivo	Positivo	Negativo	IIIB
T0-2	N2	M0	3	Positivo	Negativo	Cualquiera	IIIB
T0-2	N2	M0	3	Negativo	Positivo	Positivo	IIIB
T3	N1-2	M0	2	Negativo	Positivo	Negativo	IIIB
T3	N1-2	M0	2	Negativo	Negativo	Positivo	IIIB
T3	N1-2	M0	3	Positivo	Positivo	Negativo	IIIB
T3	N1-2	M0	3	Positivo	Negativo	Cualquiera	IIIB
T3	N1-2	M0	3	Negativo	Positivo	Positivo	IIIB

Tabla (continuación) adaptada de Hortobagyi GN, Connolly JL, D'Orsi CJ, Edge SB, Mittendorf EA, Rugo HS, et al. *Breast. In: AJCC Cancer Staging Manual [Internet]. 8th ed. Chicago: Springer International Publishing; 2017 [cited 2020 Jan 3]. p. 58*

Cuando T es...	Y N es...	Y M es...	Y G es...	Y HER2 es...	Y ER es...	Y PR es...	El grupo Estadio Pronóstico es...
T4	N0-2	M0	1	Positivo	Cualquiera	Cualquiera	IIIB
T4	N0-2	M0	2	Positivo	Positivo	Positivo	IIIB
T4	N0-2	M0	2	Negativo	Positivo	Positivo	IIIB
T4	N0-2	M0	3	Positivo	Positivo	Positivo	IIIB
Cualquiera	N3	M0	1	Positivo	Cualquiera	Cualquiera	IIIB
Cualquiera	N3	M0	2	Positivo	Positivo	Positivo	IIIB
Cualquiera	N3	M0	2	Negativo	Positivo	Positivo	IIIB
Cualquiera	N3	M0	3	Positivo	Positivo	Positivo	IIIB
T2	N1	M0	3	Negativo	Negativo	Cualquiera	IIIC
T3	N0	M0	3	Negativo	Negativo	Cualquiera	IIIC
T0-2	N2	M0	2	Negativo	Negativo	Negativo	IIIC
T0-2	N2	M0	3	Negativo	Positivo	Negativo	IIIC
T0-2	N2	M0	3	Negativo	Negativo	Cualquiera	IIIC
T3	N1-2	M0	2	Negativo	Negativo	Negativo	IIIC
T3	N1-2	M0	3	Negativo	Positivo	Negativo	IIIC
T3	N1-2	M0	3	Negativo	Negativo	Cualquiera	IIIC
T4	N0-2	M0	1	Negativo	Positivo	Negativo	IIIC
T4	N0-2	M0	1	Negativo	Negativo	Cualquiera	IIIC
T4	N0-2	M0	2	Positivo	Positivo	Negativo	IIIC
T4	N0-2	M0	2	Positivo	Negativo	Cualquiera	IIIC
T4	N0-2	M0	2	Negativo	Positivo	Negativo	IIIC
T4	N0-2	M0	2	Negativo	Negativo	Cualquiera	IIIC
T4	N0-2	M0	3	Positivo	Positivo	Negativo	IIIC
T4	N0-2	M0	3	Positivo	Negativo	Cualquiera	IIIC
T4	N0-2	M0	3	Negativo	Cualquiera	Cualquiera	IIIC
Cualquiera	N3	M0	1	Negativo	Positivo	Negativo	IIIC
Cualquiera	N3	M0	1	Negativo	Negativo	Cualquiera	IIIC
Cualquiera	N3	M0	2	Positivo	Positivo	Negativo	IIIC
Cualquiera	N3	M0	2	Positivo	Negativo	Cualquiera	IIIC
Cualquiera	N3	M0	2	Negativo	Positivo	Negativo	IIIC
Cualquiera	N3	M0	2	Negativo	Negativo	Cualquiera	IIIC
Cualquiera	N3	M0	3	Positivo	Positivo	Negativo	IIIC
Cualquiera	N3	M0	3	Positivo	Negativo	Cualquiera	IIIC
Cualquiera	N3	M0	3	Negativo	Cualquiera	Cualquiera	IIIC

Tabla(continuación) adaptada de Hortobagyi GN, Connolly JL, D'Orsi CJ, Edge SB, Mittendorf EA, Rugo HS, et al. *Breast. In: AJCC Cancer Staging Manual [Internet]. 8th ed. Chicago: Springer International Publishing; 2017 [cited 2020 Jan 3]. p. 58*

Anexos

Cuando T es...	Y N es...	Y M es...	Y G es...	Y HER2 es...	Y ER es...	Y PR es...	El grupo Estadio Pronóstico es...
Cualquiera T	Cualquiera N	M1	1-3	Cualquiera	Cualquiera	Cualquiera	IV

Tabla (continuación) adaptada de Hortobagyi GN, Connolly JL, D'Orsi CJ, Edge SB, Mittendorf EA, Rugo HS, et al. *Breast. In: AJCC Cancer Staging Manual [Internet]. 8th ed. Chicago: Springer International Publishing; 2017 [cited 2020 Jan 3]. p. 58*

8.2 ANEXO II



MODELO DE CONSENTIMIENTO

Título del estudio:

“Análisis proteómico de biomarcadores en pacientes con cáncer de mama tratado con cirugía conservadora y radioterapia intraoperatoria”

Yo, *(nombre y apellidos)*

He leído la hoja de información que se me ha entregado.
He podido hacer preguntas sobre el estudio.
He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con: *(nombre del Investigador)*

Comprendo que la participación de es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- 1º Cuando quiera
- 2º Sin tener que dar explicaciones.
- 3º Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Se ha dado toda la información pertinente adaptada a mi nivel de entendimiento y estoy de acuerdo en participar.

Y presto mi conformidad con participar en el estudio.

Firma del Participante

Firma del Investigador

Nombre:
Fecha:

Nombre:
Fecha:

8.3 ANEXO III



MODELO DE CONSENTIMIENTO DEL REPRESENTANTE LEGAL

Título del estudio:

“Análisis proteómico de biomarcadores en pacientes con cáncer de mama tratado con cirugía conservadora y radioterapia intraoperatoria”

Yo, *(nombre y apellidos)*

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con: *(nombre del Investigador)*

Comprendo que la participación de *(nombre del participante)* es voluntaria.

Comprendo que *(nombre del participante)* puede retirarse del estudio:

1º Cuando quiera

2º Sin tener que dar explicaciones.

3º Sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.

En mi presencia se ha dado a *(nombre del participante)*, toda la información pertinente adaptada a su nivel de entendimiento y está de acuerdo en participar.

Y presto mi conformidad con que *(nombre del participante)* participe en el estudio.

Firma del Representante

Firma del Investigador

Nombre:

Nombre:

Fecha:

Fecha:

8.4 ANEXO IV

 **GOBIERNO DE ARAGON**
Departamento de Sanidad

Informe Dictamen Favorable Trabajos académicos
C.P. - C.I. P117/0215
21 de junio de 2017

Dña. María González Hinjos, Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)

CERTIFICA

1º. Que el CEIC Aragón (CEICA) en su reunión del día 21/06/2017, Acta Nº 12/2017 ha evaluado la propuesta del Trabajo:

Título: Análisis proteómico de biomarcadores en pacientes con cáncer de mama tratado con cirugía conservadora y radioterapia intraoperatoria.

Alumno: Cristina Vallejo Bernad
Directora: Mª Carmen Casamayor Franco

Centro de realización: HU Miguel Servet

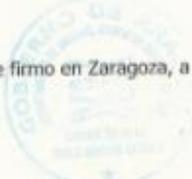
Versión protocolo: mayo/2017.
Versión Documento de información y consentimiento: Versión 02 / 26/05/2017

2º. Considera que

- El proyecto se plantea siguiendo los requisitos de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y los principios éticos aplicables.
- El Tutor/Director garantiza la confidencialidad de la información, la obtención del consentimiento informado, el cumplimiento de la LOPD y la correcta utilización de los recursos materiales necesarios para su realización.

3º. Por lo que este CEIC emite **DICTAMEN FAVORABLE a la realización del proyecto.**

Lo que firmo en Zaragoza, a 21 de junio de 2017

María González Hinjos
Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)

Tel. 976 71 48 57 Fax. 976 71 55 54 Correo electrónico mgonzalezh.ceic@aragon.es

Página 1 de 1