

- TREBALL DE RECERCA -

# OSNA I EL SEU PAPER EN LA DETECCIÓ DE METÀSTASI DEL CÀNCER DE MAMA

Autoria: Forelsket  
2n de Batxillerat

12 de desembre de 2016

## AGRAÏMENTS

La realització d'aquest treball no hauria estat possible sense la magnífica ajuda i atenció per part de diversa gent, als quals no podria estar més agraïda.

En primer lloc, donar les gràcies a la Dra. Cristina Sans, treballadora de l'empresa Sysmex, per la seva dedicació, ajuda i presència constant, contestant-me les preguntes que fessin falta i donant-me l'oportunitat de fer una anàlisi als laboratoris de l'empresa. Sense aquesta ajuda no hauria estat possible bona part d'aquest treball.

Donar també les gràcies a la meva tieta Imma Collet i Diví i al Dr. Josep M<sup>a</sup> Corominas, de l'Hospital del Mar, per les seves explicacions i informació tant sobre el càncer de mama com sobre l'OSNA, i per ajudar-me en el que em fes falta.

Seguidament, agrair a en Gábor Cserni la seva dedicació, constància, atenció i encoratjament, i per les explicacions i dades que m'ha proporcionat.

Moltes gràcies també a la Dra. Cristina Saura i al Dr. Vicente Peg, de l'Hospital Vall d'Hebron, per la seva ajuda, donar-me el seu punt de vista i proporcionar-me articles i informació.

Agrair també l'ajuda, paciència i assessorament a la meva família i amics, sense el suport dels quals se m'hagués fet més difícil el procés de realització del treball.

També m'agradaria donar les gràcies a la meva professora de biologia, per la seva dedicació, assessorament i ajuda en tot moment, i per haver-me donat un altre punt de vista envers el treball.

Totes les persones esmentades anteriorment han destinat part del seu temps al meu treball de manera solidària i voluntària. Sense la seva ajuda hauria estat impossible poder fer-lo, així que els estic sincerament molt agraïda a tots i totes.

# ÍNDIX

1. Introducció .....	5
2. Objectius.....	6
3. Metodologia .....	7
CONEIXEMENTS PREVIS .....	8
4. Sistema limfàtic.....	8
4.1. Ganglis limfàtics .....	9
4.1.1. Estructura i funcionament dels ganglis limfàtics .....	11
4.1.2. Ganglis sentinella.....	12
5. La glàndula mamària .....	14
5.1. Òrgan i anatomia.....	14
6. Càncer de mama .....	15
6.1. Tipus de càncer de mama .....	15
6.2. Causes .....	17
6.3. Síntomes .....	19
6.4. Metàstasi.....	19
6.5. Tractament .....	21
6.5.1. Radioteràpia .....	22
6.5.2. Quimioteràpia .....	22
6.5.3. Tractament hormonal.....	23
6.5.4. Tractament quirúrgic .....	23
RECERCA ESPECÍFICA SOBRE LA TÈCNICA DE L'OSNA .....	27
7. L'OSNA.....	27
7.1. Aplicacions de l'OSNA.....	28
8. Realització d'una anàlisi d'OSNA.....	30
8.1. Equipament, material i reactius .....	31
8.2. Realització de la tècnica .....	32
8.2.1. Recepció de la mostra .....	32
8.2.2. Posada en marxa de l'equip.....	32
8.2.3. Preparació dels reactius Lynoamp .....	34
8.2.4. Calibració de la corba estàndard.....	35
8.2.5. Preparació i anàlisi de les mostres.....	36

8.2.6. Resultats .....	38
8.2.7. Neteja de l'equip .....	40
9. Discussió .....	41
10. Valoració de l'OSNA: punts de vista.....	43
10.1. Fonts .....	43
10.2. Resultats .....	44
10.2.1. Dr. Gábor Cserni.....	44
10.2.2. Dr. Corominas, de l'equip d'oncologia i radiologia de l'Hospital del Mar de Barcelona .....	45
10.2.3. Dra. Cristina Saura i Dr. Vicente Peg .....	45
10.2.4. Dr. Owen Ung i Dr. Sunil Lakhani.....	46
10.3. Discussió.....	47
11. Conclusions del treball.....	48
12. Annex 1: tècnica RT-LAMP .....	49
13. Bibliografia .....	52

# 1. INTRODUCCIÓ

S'estima que l'any 2015, a Catalunya, es van diagnosticar uns 4.500 nous casos de càncer de mama en dones. És el tumor més diagnosticat entre les dones, representant un 28% de tots els tumors malignes. De cada 100.000 dones, 67 seran diagnosticades d'aquest tipus de càncer, una xifra lleugerament inferior a l'europea, que és de 71 dones.

La taxa de mortalitat és de 10 casos per 100.000 dones, xifra que des de l'any 1993 ha anat disminuint progressivament com a conseqüència de les millores terapèutiques i dels programes de detecció precoç implementats des dels hospitals. Comparativament amb altres càncers, la supervivència al cap de 5 anys des del diagnòstic és relativament elevada, d'un 84%.

Això, però, no vol dir que no es pugui aconseguir una taxa de supervivència més elevada i una millora de la qualitat de vida de les pacients, sinó tot el contrari. Any rere any es realitzen centenars d'estudis arreu del món intentant buscar nous medicaments, tractaments i tècniques que millorin els actuals per tal de poder oferir un millor pronòstic en el màxim de casos possibles.

L'any 2004 es va començar un projecte, des de l'empresa farmacèutica Sysmex, al Japó, que buscava una tècnica de diagnòstic de metàstasi del càncer de mama de manera més efectiva, al que van anomenar OSNA. Els primers estudis fets a Espanya van començar el 2008 a l'Hospital Lluís Alcanyís de Xàtiva, obtenint els primers resultats el 2011. Des d'aleshores, aquesta tècnica ha començat a fer-se lloc en diversos hospitals de tot el món.

En aquest treball explicaré en què consisteix aquesta tècnica i quin punt de vista tenen diversos professionals al respecte. Així doncs, començaré parlant de forma més teòrica sobre els ganglis limfàtics, necessaris per poder dur a terme un anàlisi d'OSNA, i també de què és el càncer de mama, els tipus que hi ha, les causes i els símptomes que es coneixen, i com es produeix la metàstasi. Exposaré també els diferents tipus de tractaments tant de diagnòstic com de cura que existeixen actualment.

Seguidament, procediré a explicar què és l'OSNA, en què consisteix, i quins avantatges ofereix, des del punt de vista de la pròpia empresa, respecte al mètode utilitzat prèviament per a detectar les possibles metàstasis del càncer: l'anàlisi histològica. Tot seguit mostraré les diverses aplicacions que pot tenir l'OSNA a banda de facilitar el diagnòstic del càncer de mama, i acabaré descrivint una anàlisi feta per mi mateixa amb aquesta tècnica dient, al detall, quins són els materials necessaris, tots els passos que cal seguir, i com interpretar correctament els resultats obtinguts.

Finalment, comentaré des d'un punt de vista crític, basant-me en les diferents opinions de diversos professionals en l'àmbit del càncer de mama, l'estat actual de la implantació als hospitals de la tècnica de l'OSNA i les seves perspectives de futur.

## 2. OBJECTIUS

Els meus objectius en aquest treball són els següents:

- Aprofundir coneixements relacionats amb el càncer de mama, el seu desenvolupament i el seu tractament.
- Entendre en què consisteix la tècnica de l'OSNA i saber quins avantatges en presenta l'empresa.
- Conèixer la metodologia pas a pas per a poder realitzar i interpretar una anàlisi d'OSNA.
- Contrastar els diversos punts de vista respecte a l'OSNA de diferents professionals en l'àmbit.
- Comparar la tècnica de l'OSNA amb l'anàlisi histològica.
- Explicar la situació actual de la tècnica de l'OSNA basant-me en els diversos punts de vista envers l'aplicació d'aquesta.

### 3. METODOLOGIA

Amb la finalitat d'assolir els objectius plantejats a l'inici d'aquest treball, he començat amb la recerca d'informació tant en llocs web com en centres hospitalaris, així com en articles científics i de caràcter divulgatiu. També he mantingut entrevistes en persona i per correu electrònic amb professionals en l'àmbit del càncer de mama per tal de conèixer la seva visió envers l'OSNA.

La part teòrica del treball ha consistit a recollir informació trobada en pàgines web i en articles científics per a familiaritzar-me amb el tema i tenir una base per a poder entendre posteriorment en què consisteix l'OSNA i els punts de vista dels diversos professionals.

Per la part més pràctica, m'he posat en contacte amb doctors especialitzats en càncer de mama de dos hospitals de Barcelona i un d'Hongria, i amb una treballadora de l'empresa Sysmex. El contacte amb el primer hospital, l'Hospital del Mar de Barcelona, va ser gràcies a la germana del meu pare, l'Imma Collet Diví, infermera en aquest hospital que des de fa anys està en el departament de càncer de mama i en la unitat de prevenció d'aquest mateix tipus de càncer. Ella em va posar en contacte amb el Dr. Josep M<sup>a</sup> Corominas, metge en cap de la Unitat de Càncer de Mama i professor de medicina.

D'altra banda, vaig contactar amb la Dra. Cristina Saura i el Dr. Vicente Peg, tots dos de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron, i amb el Dr. Gábor Cserni, professor de medicina a la Universitat de Szeged. A tots ells els vaig conèixer buscant articles científics sobre l'OSNA que, sortosament per a mi, contenien el correu electrònic dels autors.

Finalment, em vaig posar en contacte amb una treballadora de l'empresa Sysmex, la Dra. Cristina Sans, amb qui vaig contactar a través d'una companya de feina del meu pare.

## CONEXIEMENTS PREVIS

### 4. SISTEMA LIMFÀTIC

El sistema limfàtic és un dels components de l'aparell circulatori que s'encarrega de transportar unidireccionalment cap al cor la limfa, un líquid transparent les funcions del qual són recol·lectar i retornar el líquid intersticial (localitzat a l'espai entre cèl·lules) a la sang, defensar el cos contra organismes patògens i absorbir els nutrients de l'aparell digestiu i abocar-los a les venes subclàvies.

Es distingeix del sistema sanguini pel fet que els seus vasos van des dels teixits cap al cor, per tant, hi ha capil·lars i venes limfàtiques, però no artèries. Està constituït pels components següents:

- Capil·lars i venes limfàtiques: els capil·lars es van reunint en vasos més grans, les venes limfàtiques. Aquestes, tenen unes vàlvules la funció de les quals és evitar que la limfa pugui recular.
- Ganglis limfàtics: és on maduren alguns limfòcits i on són filtrades i eliminades diferents substàncies estranyes i bacteris, amb la finalitat que no aconseguixin arribar a la sang.

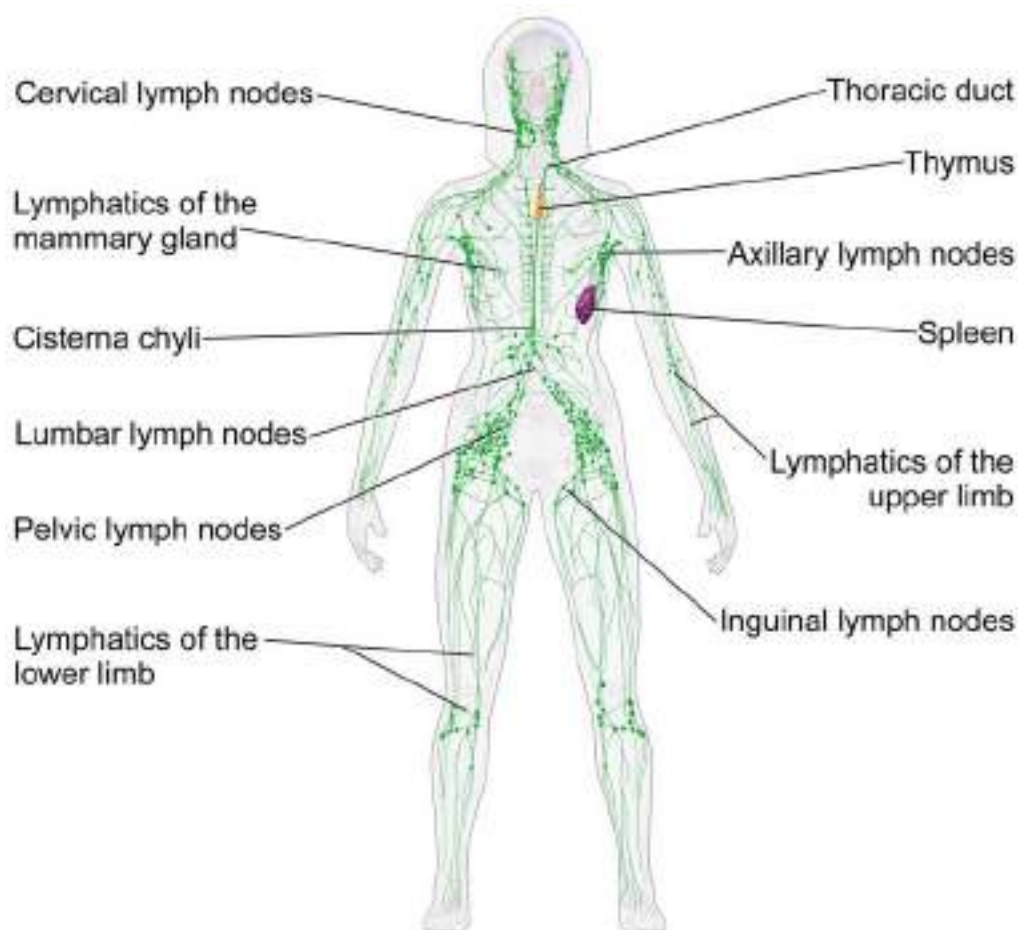
El sistema limfàtic té diverses funcions, les més importants són:

- Recollida i drenatge de l'excés de líquid que s'acumula en els teixits i que no pot ser totalment reabsorbit pels capil·lars sanguinis. Dels 20 litres que es filtren a través dels capil·lars cap al líquid intersticial, de 16 a 18 són reabsorbits de nou pels capil·lars sanguinis, mentre que entre 2 i 4 litres retornaran a la sang a través del sistema limfàtic.
- Maduració de limfòcits que participaran en la funció immunitària i de defensa.
- Filtració de bacteris i d'altres partícules en els ganglis limfàtics.
- Absorció i transport de greixos, ja que gràcies als vasos limfàtics de la mucosa intestinal, el sistema limfàtic absorbeix els greixos i vitamines liposolubles que es troben a l'intestí durant la digestió, per transportar-los després fins al sistema venós sanguini sense passar pel fetge.



## 4.1. GANGLIS LIMFÀTICS

Els ganglis o nòduls limfàtics són components del sistema limfàtic que actuen com a filtres de la limfa, ja que posseeixen una estructura interna de teixit connectiu en forma de xarxa, plena de limfòcits que detecten agents externs perjudicials per a l'organisme. És per això que els ganglis formen part també del sistema immunitari, ja que ajuden el cos a reconèixer i combatre infeccions i diverses substàncies. Estan repartits al llarg de tot l'organisme agrupats en grups: cada conjunt de nòduls correspon a una regió particular del cos i reflecteix les anomalies de la seva zona.



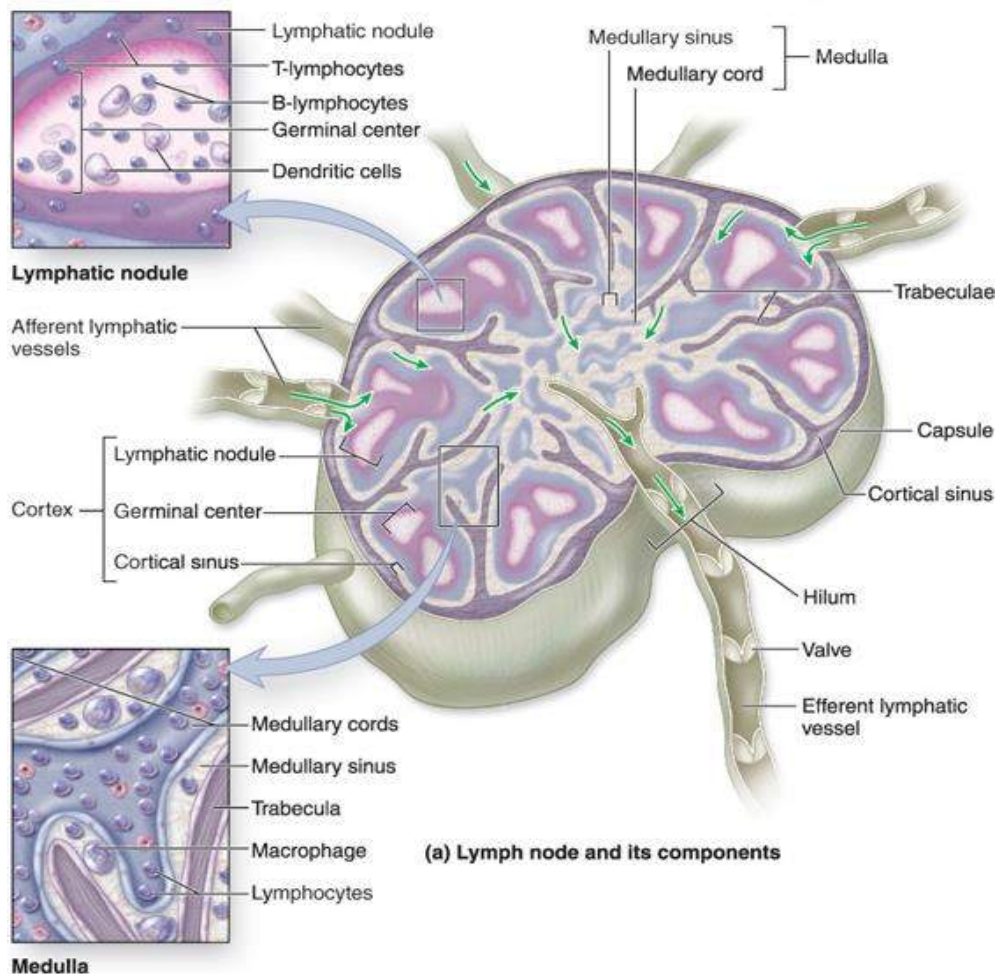
**Figura 1.** Imatge descriptiva de les localitzacions dels ganglis limfàtics distribuïts al llarg de l'organisme. FONT: Wikipedia.org

Els ganglis limfàtics humans tenen una forma semblant a la dels ronyons humans, i la seva mida pot variar d'entre pocs mil·límetres fins a 1 o 2 centímetres en el seu estat natural. Tot i així, la seva mida pot augmentar a causa d'algun tumor o a una infecció. Els limfòcits estan situats dins les estructures en forma de rusc dels ganglis limfàtics. Aquests augmenten de mida (adenopatia) quan hi ha una infecció, principalment perquè augmenta el transport de limfòcits des de la sang cap al gangli fins a ser superior que el transport invers. D'altra banda, també

s'engrandeixen com a conseqüència de l'activació i proliferació de cèl·lules B i T específiques de l'antigen (expansió clonal). En alguns casos, els ganglis limfàtics poden augmentar a causa d'una infecció prèvia i mantenir-se amb aquesta mida durant un temps encara que l'organisme ja estigui sa.

Aproximadament el 75% de la limfa que prové de les mames va cap als ganglis limfàtics de l'axil·la del mateix costat. La resta va cap als nòduls paraesternals, a la mama del costat oposat, i finalment es dirigeix cap als ganglis limfàtics abdominals. El drenatge limfàtic de les mames drena en els ganglis limfàtics de l'axil·la.

Aquest drenatge té una gran importància en l'àmbit de l'oncologia, ja que les mames són una zona on freqüentment s'hi desenvolupa càncer. D'aquesta manera, si les cèl·lules malignes es desprenen del teixit mamari, podrien dispersar-se a altres parts del cos a través del sistema limfàtic produint metàstasis (extensió d'una malaltia d'un òrgan o part cap a un altre òrgan o part, fet que tan sols poden dur a terme els tumors malignes i les infeccions).



**Figura 2.** Il·lustració d'un gangli limfàtic tot assenyalant-ne i anomenant-ne les diverses parts i components. FONT: Dr. Odd, drodd.com

#### 4.1.1. ESTRUCTURA I FUNCIONAMENT DELS GANGLIS LIMFÀTICS

La limfa arriba al gangli limfàtic a través dels vasos aferents. Un cop dins, es filtra la limfa i es forma la resposta immunitària cel·lular en entrar en contacte amb els components actius immunitaris. Un cop filtrada, la limfa surt pel vas limfàtic eferent, propaga la resposta immunitària i arriba a la sang.

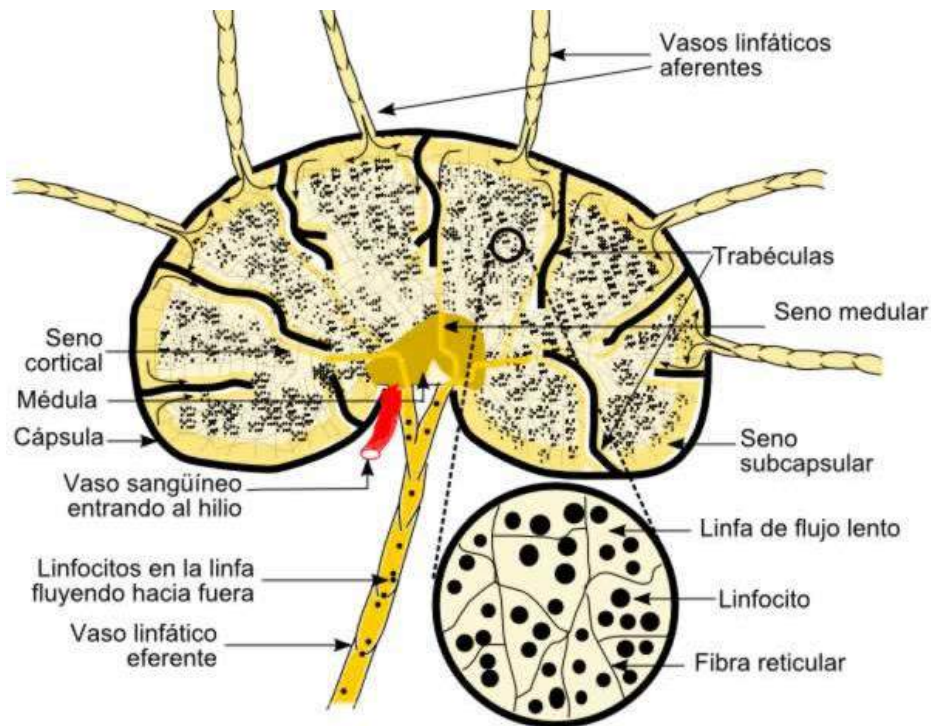
Els ganglis limfàtics estan envoltats per una prima càpsula fibrosa que es ramifica cap a l'interior formant unes fibres reticulars, anomenades trabècules, que constitueixen un teixit de suport a l'interior del gangli. La part cònca del gangli, anomenada hílum, és la que connecta la medul·la, situada a l'interior de l'òrgan, amb la superfície, i és també el lloc per on els vasos eferents s'introdueixen en el gangli i permeten que la sang en pugui entrar i sortir.

Les fibres reticulars, juntament amb l'elastina, formen una xarxa a l'interior del nòdul anomenada xarxa reticular. Aquesta no té només una funció estructural, sinó que també proporciona una superfície d'adherència per als leucòcits, de manera que els limfòcits (varietat agranular de leucòcits) poden dur a terme la seva funció de recollir i destruir bacteris i virus.

Un si limfàtic és un canal dins del mateix gangli limfàtic, recobert per cèl·lules endotelials, que permet el flux de la limfa. Hi ha tres tipus de si: el subcapsular, el cortical i el medul·lar. El si subcapsular és un si situat immediatament sota la càpsula, per tant, el seu endoteli és contigu amb el del vas limfàtic aferent. També és contigu amb algun si similar que voreja les trabècules (ramificacions del còrtex), anomenat si cortical. Aquest últim aboca la limfa cap al si medul·lar, situat a l'interior del gangli, que al seu torn la transporten cap als vasos limfàtics eferents.

En el còrtex s'hi poden diferenciar dues parts segons el tipus de cèl·lules que s'hi troben. El còrtex exterior està compost principalment de limfòcits B que poden desenvolupar un centre germinal quan són estimulats per un antigen, mentre que el còrtex més intern consisteix principalment de cèl·lules T.

Els múltiples vasos aferents, que es ramifiquen i formen una extensa xarxa dins la càpsula, transporten la limfa cap a l'interior gangli limfàtic. Aquesta limfa entra al si subcapsular, que al seu torn drena cap al si cortical. La limfa es filtra lentament a través del gangli i, finalment, arriba a la medul·la. Durant el trajecte es troba amb els limfòcits, fet que pot comportar la seva activació com a part de la resposta immunitària adaptativa.



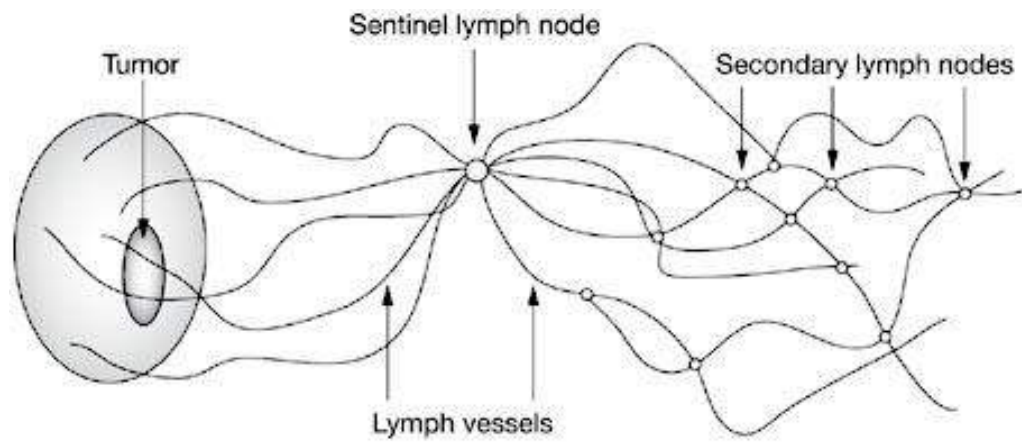
**Figura 3.** Il·lustració d'un gangli limfàtic amb les diferents parts que el formen assenyalades. FONT: Guillermo Pérez, ganglioslinfaticos.com

#### 4.1.2. GANGLIS SENTINELLA

El gangli sentinella és el primer gangli d'una cadena limfàtica que drena una zona tissular determinada, de manera que abans de continuar el seu camí per la cadena, tota la limfa ha de passar per aquest gangli.

Aquest concepte té una gran importància en el camp de l'oncologia, ja que de la mateixa manera que la limfa d'una zona concreta ha de progressar de manera esglaonada pels ganglis d'una cadena limfàtica, les cèl·lules tumorals que es puguin desprendre d'un tumor també hauran de fer aquest mateix recorregut, passant primer pel gangli sentinella. D'aquesta manera, l'estat del gangli sentinella d'una cadena, pel que fa a la seva invasió o no per part de cèl·lules tumorals pot indicar, amb gran exactitud, l'estat de la resta de ganglis de la cadena limfàtica.

Aquesta tècnica és utilitzada per a tractar càncer de mama a tots els hospitals, però a l'hora d'aplicar-la a altres càncers (còlon, gàstric), hi ha discrepàncies dins del món sanitari, ja que no és segur afirmar l'existència de ganglis sentinella en aquestes zones del cos, o que sigui útil analitzar tots els ganglis sentinella, ja que en algunes zones (com a la zona gàstrica) poden haver-n'hi en grans quantitats.



**Figura 4.** Imatge explicativa de la posició estratègica del gangli sentinella. FONT: Nature Publishing Group, nature.com

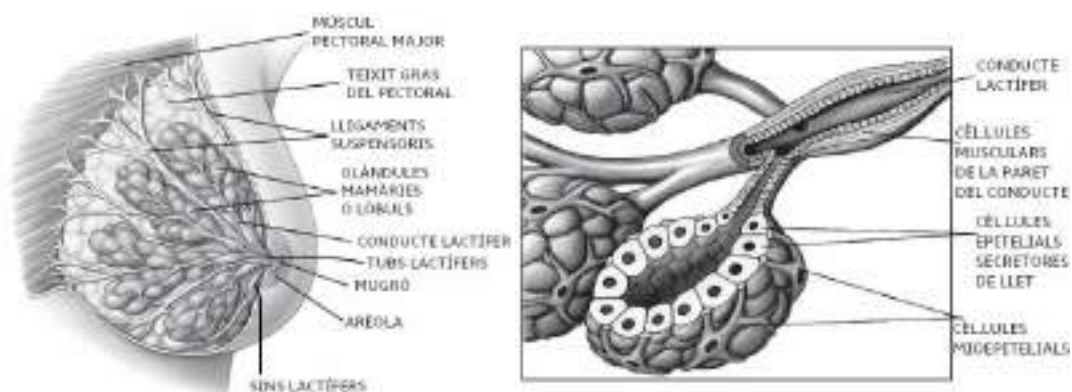
## 5. LA GLÀNDULA MAMÀRIA

### 5.1. ÒRGAN I ANATOMIA

Els pits són uns òrgans parells de forma semiesfèrica situats sobre el múscul pectoral major. Cada mama limita a la seva cara posterior amb el múscul pectoral, i conté un abundant teixit gras allà on no hi ha teixit glandular. El greix i el teixit connectiu, juntament amb els lligaments de Cooper, que uneixen la glàndula amb la pell, constitueixen un fort lligament, de manera que donen forma i sostenen la mama. El pit, a més a més, conté vasos arterials, limfàtics i venosos, així com elements nerviosos.

En l'àmbit intern, el pit està constituït en un 90% per teixit adipós. A més a més, integrats al teixit hi ha diversos òrgans, encarregats de la secreció de la llet materna: els lòbuls i els conductes lactífers.

Els lòbuls es distribueixen per tot el pit, encara que les dues terceres parts d'aquest teixit es troben en els 30 mil·límetres més pròxims a la base del mugró. Aquests òrgans drenen en el mugró mitjançant diversos conductes, que formen una xarxa ordenada de manera radial que finalitza en el mugró. Aquests conductes es poden classificar en tres tipus. Els primers, que surten directament dels lòbuls, s'anomenen conductes lactífers. Aquests drenen als sins lactífers o galactòfors, on s'emmagatzema la llet, i aquests fan el mateix fins als tubs lactífers, que arriben a l'exterior del mugró en períodes de lactància.



**Figura 5.** Organització i estructura de la glàndula mamària. FONT: blogdebiologia.com

## 6. CÀNCER DE MAMA

El càncer de mama és una proliferació maligna de les cèl·lules epitelials que envolten els conductes o lòbuls mamaris. És una malaltia clonal, on una cèl·lula individual, a causa d'una sèrie de mutacions somàtiques, adquireix la capacitat de dividir-se sense cap mena de control ni ordre, de manera que es reproduïx fins a formar un tumor. Aquest, que comença com una anomalia lleu, passa a ser cada cop més greu, envaeix teixits veïns i, finalment, es propaga a altres parts del cos, produint la metàstasi.

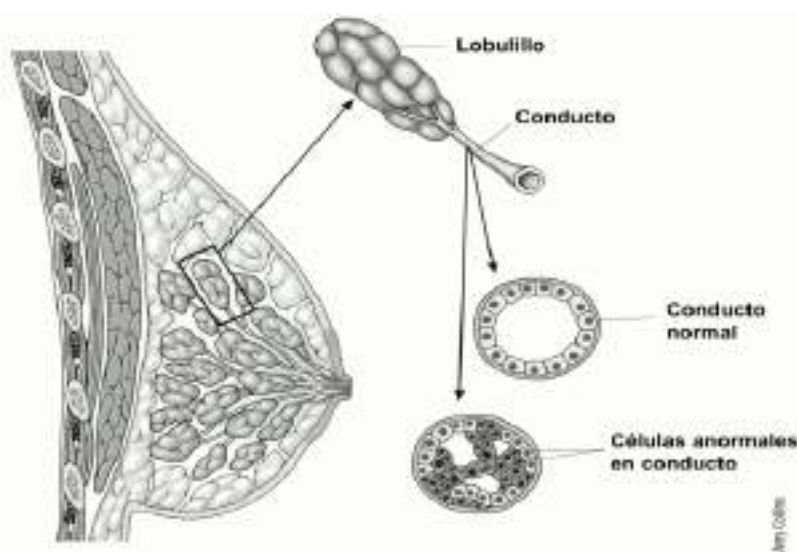
El càncer de pit pot començar des de diferents parts de la mama. La majoria comencen en els conductes que condueixen la llet materna fins al mugró (càncer ductal), i alguns altres comencen als lòbuls que produeixen la llet (càncer lobular). També n'hi ha d'algun altre tipus, tot i que són poc comuns.

### 6.1. TIPUS DE CÀNCER DE MAMA

Hi ha diversos tipus de càncer de mama, però es poden classificar en dues grans categories:

#### - Carcinoma ductal *in situ* (CDIS) o carcinoma intraductal

Consisteix en l'aparició d'una població maligna de cèl·lules que no travessen la membrana de l'epiteli dels conductes lactífers i, per tant, no poden produir metàstasi a distància. Tot i així, aquestes cèl·lules es poden escampar a través del sistema ductal causant així lesions de gran mida que poden afectar els conductes de tota la zona de la mama, però mai poden escampar-se als teixits de la mama ni fora d'aquesta. Se sol considerar aquest tipus un precàncer, ja que en alguns casos, amb el temps, es pot convertir en carcinoma invasiu, tot i que no se sap identificar en quins casos passarà i en quins no.



**Figura 6.** Carcinoma ductal *in situ* vist en secció. FONT: American Cancer Society, cancer.org

La malaltia de Paget del mugró està quasi sempre associada al CDIS i a vegades també al carcinoma ductal invasiu, i és un tipus de càncer que s'estén des dels conductes del pit fins al mugró i l'arèola. És molt poc comú, ja que representa tan sols un 1% dels casos de càncer de mama. Consisteix en l'acumulació de cèl·lules canceroses al voltant d'aquesta zona, i comporta l'aparició de crostes a la pell del mugró i l'arèola, i l'envermelliment d'aquesta mateixa, que també pot tenir zones que sagnin o supurin.

#### - Carcinoma invasiu

Són els carcinomes que tot i començar localitzats en un sol lloc, s'acaben estenent cap a altres teixits i fins i tot altres zones del cos.

- Carcinoma ductal invasiu: És el tipus més comú de càncer de mama, ja que comprèn el 80% dels casos. Aquest càncer apareix com un nòdul ben delimitat situat en un conducte lactífer del pit i travessa la paret d'aquest fins a arribar al teixit adipós de la mama, on comença a créixer. A partir d'aquí pot tenir la capacitat de propagar-se (fer metàstasi) cap a altres parts del cos a través del sistema limfàtic i del torrent sanguini.
- Carcinoma lobular infiltrant: Tot i que constitueix tan sols entre el 5 i el 10% dels carcinomes de mama, té un interès particular a causa dels següents motius: és bilateral amb molta més freqüència que la resta, ja que la possibilitat de càncer a la mama contralateral augmenta en un 20% quan es té el càncer en un dels pits, i sol ser multicèntric, és a dir, hi ha més d'un tumor, cadascun dels quals s'ha format per separat de la resta. A més a més, és més difícil de detectar en una mamografia que el carcinoma ductal invasiu.
- Carcinoma medul·lar: representa entre un 1 i un 5% de tots els carcinomes de mama, i sol afectar a dones més joves que la mitjana d'edat de la resta de carcinomes convencionals. Té una mida d'entre 2 i 3 cm de diàmetre. Hi ha estudis que demostren que aquest tipus de càncer és més habitual en dones que presenten una mutació en el gen BRCA1, i que en alguns països és més comú que en d'altres, per exemple, es diagnostiquen més casos al Japó que als Estats Units. Aquest carcinoma no creix ràpidament, i generalment no sol propagar-se fora la mama.
- Carcinoma tubular: representa entre un 1 i un 2% dels casos de càncer de pit. El tumor és generalment petit i està format per cèl·lules amb forma de tub que són de baix grau, és a dir, que tenen una aparença similar a les cèl·lules sanes i solen créixer lentament. Aquests tumors són sovint multicèntrics dins la mateixa mama, i bilaterals, però no solen propagar-se a altres parts del cos.

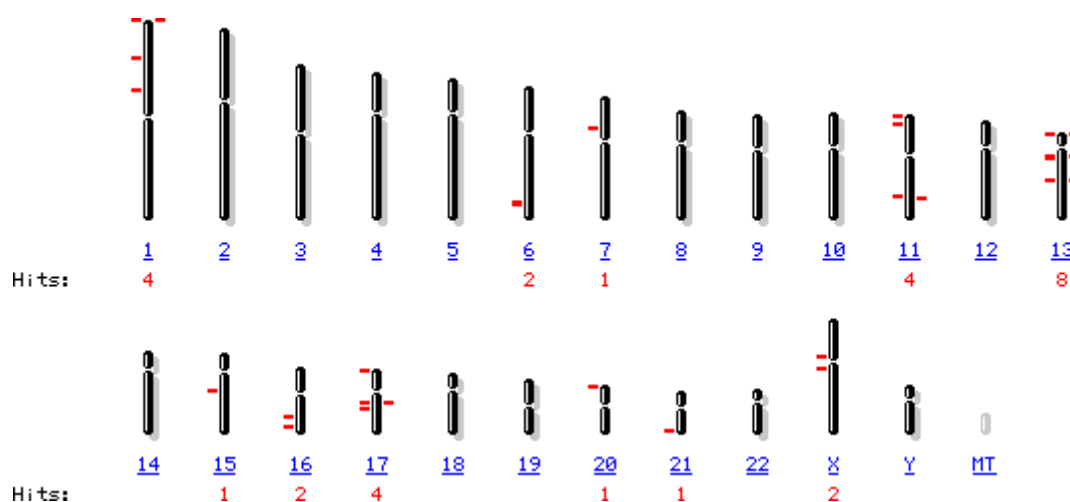
Cal apuntar, però, que aquestes dades són extretes de països occidentals. Depenent dels hàbits de cada cultura podrien variar lleugerament.



## 6.2. CAUSES

Com en la resta de càncers, les causes que provoquen el càncer de mama són desconegudes. No obstant això, s'han pogut identificar diferents factors de risc que predisposen a desenvolupar la malaltia (13; 15):

- Edat: és el principal factor de risc. A mesura que la dona es fa gran té més possibilitats de patir càncer de mama.
- Sexe: les dones tenen un risc 100 vegades major que els homes de patir càncer de pit.
- Genètica: les dones amb antecedents familiars de càncer de mama tenen més risc de patir-lo. Aquest risc incrementa si el familiar és la mare, germana o filla. Tot i així, més del 75% de les dones afectades no tenen antecedents familiars. Els gens relacionats amb el càncer de mama que es coneixen actualment, segons un estudi de la Universitat Autònoma de Barcelona, tenen la següent localització:



**Figura 7.** Il·lustració esquemàtica de la localització dels gens relacionats amb el càncer de mama coneguts (assenyalats amb una línia vermella al lateral). FONT: Bioinformàtica UAB, bioinformatica.uab.es

D'acord amb un article publicat per la revista científica Nature anomenat "Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer" (63), d'entre aquests gens cal destacar la importància del BRCA-1 i el BRCA-2.

- Factors hormonals i reproductius: l'aparició del primer cycle menstrual abans dels onze anys i una menopausa més tard dels 55 incrementen el risc de patir càncer de pit en un ½ respecte de la població general. No tenir fills o tenir el primer després dels 30 anys i fer una teràpia de reemplaçament amb estrògens i píndoles anticonceptives també en

poden incrementar el risc. No obstant això, aquesta darrera causa està molt en dubte, ja que depenent de quins estudis es mirin ho poden afirmar o negar. El que sí que se sap segur és que si hi ha un tumor present, els estrògens n'afavoreixen el creixement.

És fals que l'embaràs augmenti el risc de patir aquest càncer, el que passa és que amb les visites ginecològiques, que són més habituals en aquest període, s'incrementa la probabilitat de detecció.

- Càncer de mama anterior: aquelles pacients que han tingut un càncer de mama invasiu tenen més risc de patir un càncer de mama contralateral. El risc de recaure un altre cop s'incrementa entre un 0,5 – 0,7% per any que passa després del primer diagnòstic. D'aquesta manera, 20 anys més tard, entre un 10 i un 15% de les dones que han patit aquest càncer en tornaran a tenir un altre.
- Densitat mamària: si és alta, també es relaciona amb aquest càncer.
- Radiacions ionitzants: una exposició a aquest tipus de radiacions, especialment durant la pubertat, augmenta la possibilitat de tenir càncer de mama.
- Dieta: hi ha estudis que afirmen que les dietes que són riques en greixos o les que són pobres en fibra o en vitamines A o E poden afavorir el risc de patir càncer de pit.
- Exercici: una manca d'exercici pot augmentar el risc d'aparició d'aquest càncer.
- Ètnia: hi ha estudis que afirmen que les dones d'ètnia blanca tenen un risc més elevat de desenvolupar aquest càncer que les dones d'altres ètnies.
- Obesitat.
- Consum d'alcohol.

### 6.3. SÍMPTOMES

Hi ha diversos símptomes que indiquen la possibilitat que la persona pateixi càncer de mama. Els més importants dels símptomes són:

- Aparició d'un nòdul a la mama o a l'aixella.
- Dolor a la mama en palpar-la.
- Canvi de mida d'algun dels pits.
- Irregularitats en el contorn.
- Menor mobilitat d'un dels pits en aixecar els braços.
- Alteració de la pell de la mama (úlceres, canvis de color i aparició de l'anomenada pell taronja, a causa de la seva similitud amb la pell d'aquesta fruita).
- Canvis en el mugró, com pot ser la seva pròpia retracció (enfonsament).
- Descamació del mugró.
- Sortida de sang o algun altre líquid del mugró.

Hi ha també altres símptomes, com la fatiga i el dolor ossi localitzat, que poden aparèixer en fases més avançades de la malaltia.

### 6.4. METÀSTASI

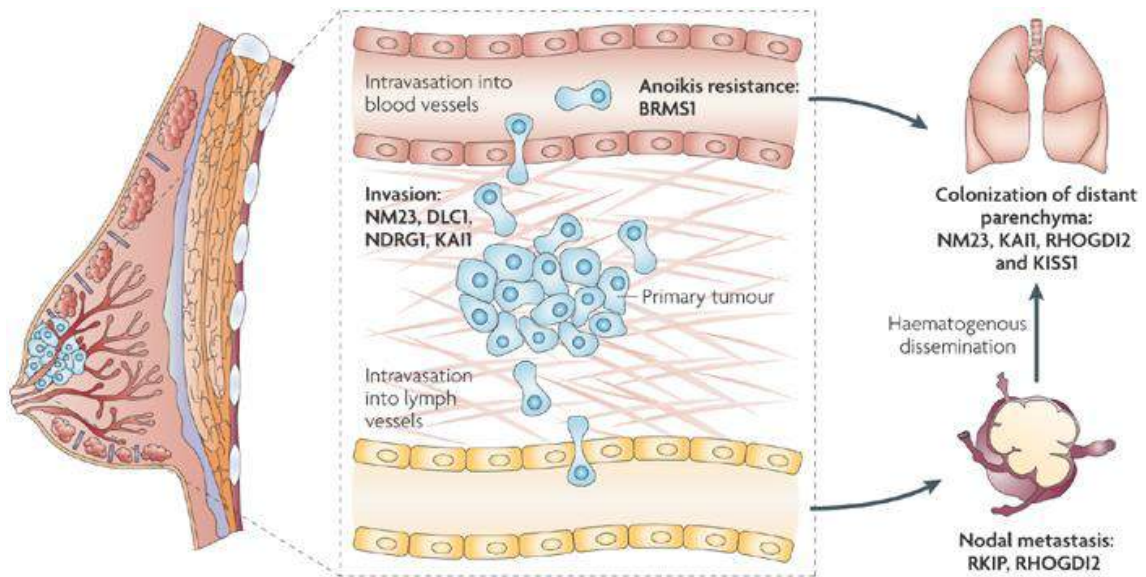
Les cèl·lules canceroses tenen la capacitat de desprendre's o filtrar-se des d'un tumor primari, entrar als vasos limfàtics o sanguinis, circular pel torrent sanguini i situar-se i créixer en altres teixits sans de qualsevol part del cos. La metàstasi és un dels tres trets que diferencien un tumor maligne d'un de benigne.

Quan les cèl·lules tumorals metastatitzen, el nou tumor que es forma s'anomena *tumor secundari* o *metastàtic*, i les cèl·lules són histològicament iguals a les del tumor primari. És a dir, si per exemple un càncer de pit metastatitza al pulmó, les cèl·lules del tumor secundari seran provinents del tumor del pit. En aquest cas, el tumor s'anomenaria càncer de mama metastàtic i no càncer de pulmó.

Normalment, la metàstasi es produeix uns anys més tard que el tumor primari, tot i que a vegades és diagnosticada al mateix moment que el tumor primari i, rarament, fins i tot abans que el tumor original.

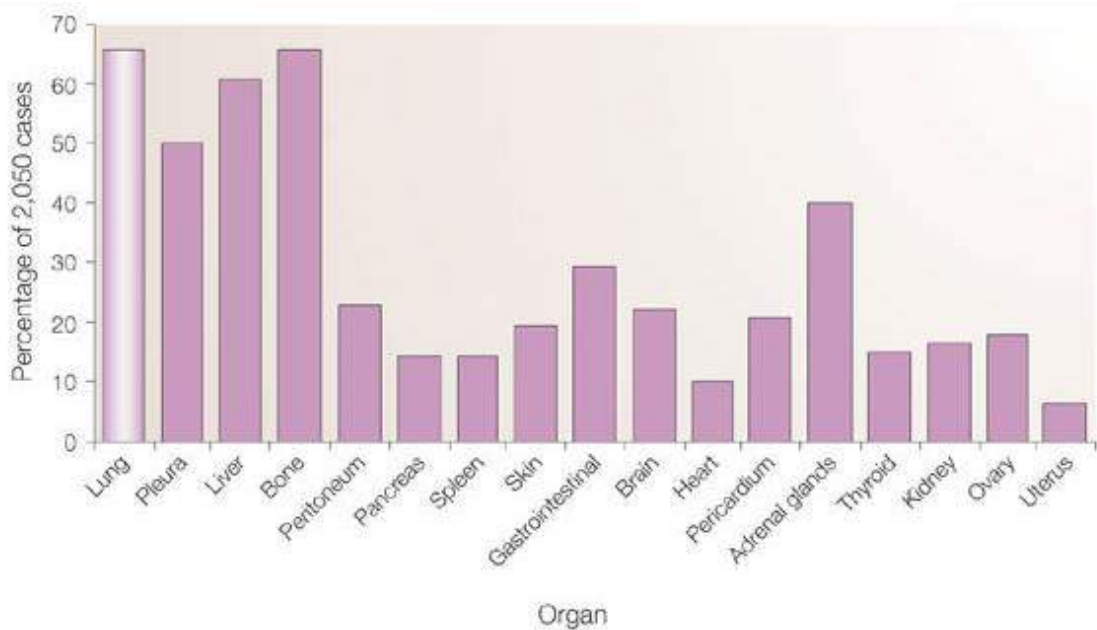
Estadísticament, entre un 20 i un 40% de tots els casos de càncer de pit faran metàstasi en algun moment o altre (29). En el cas d'aquest tipus de càncer, les dues direccions cap a les quals s'estén el tumor són els ganglis limfàtics axil·lars i els ganglis limfàtics situats al llarg de l'artèria mamària interna. Quan les cèl·lules

tumorals s'han estès fins més enllà dels ganglis limfàtics de l'aixella, el càncer passa a anomenar-se "sistèmic", ja que a partir d'aquest punt ja no s'ha de tractar només la mama, sinó tot l'organisme sencer. El càncer de mama metastàtic pot ser tractat fins i tot durant anys, però actualment no té cura. Les metàstasis a distància provoquen entre un 80 i un 90% de les morts a causa de càncer de mama.



**Figura 8.** Representació de la metàstasi del càncer de mama a través de les vies sanguínies i dels vasos limfàtics. FONT: Nature Publishing Group, nature.com

Al voltant de la tercera part de les pacients presenten metàstasi en els ganglis en el moment del diagnòstic inicial del càncer de mama. Les metàstasis a través de la via sanguínia poden afectar pràcticament qualsevol òrgan, tot i així, els que queden afectats més sovint són els pulmons, la pleura, els ossos, el fetge, les glàndules suprarenals, els intestins i el cervell. El tractament del càncer metastàtic depèn de la localització del tumor secundari, i inclou la cirurgia, la radiació, la quimioteràpia i la teràpia hormonal. Aproximadament un 70% de les morts a causa de càncer de mama són degudes a una metàstasi del càncer als ossos, i un altre 10% són a causa de metàstasi al cervell (29).



**Gràfica 1.** Grau de possibilitat de rebre metàstasi procedent d'un càncer de mama segons l'òrgan. FONT: Nature Publishing Group, nature.com

Recentment, alguns estudis (67) indiquen que els limfòcits T reguladors, que actuen suprimint l'activació del sistema immunitari de l'organisme, afavorint així la tolerància cap als autoantígens propis del cos, podrien jugar un paper clau en la metàstasi del càncer. Es creu que els limfòcits T produeixen una proteïna que podria accelerar la propagació de les cèl·lules tumorals de la mama cap a altres parts del cos. La proteïna que secreten els limfòcits T s'anomena RANKL, i s'ha vist que influeix en l'habilitat dels limfòcits de propagar les cèl·lules tumorals. Per això, es creu que interferint en la proteïna RANKL de manera que interactui de diferent manera amb els limfòcits T, es pot inhibir significativament la rapidesa en què es produeix la metàstasi.

## 6.5. TRACTAMENT

Hi ha diferents modalitats de tractament, entre les quals cal mencionar la radioteràpia, la quimioteràpia, la teràpia hormonal i la cirurgia. En funció de la mida del tumor i dels diferents factors pronòstics, s'ha d'avaluar la combinació més adequada dels diferents recursos terapèutics.

Quan el volum del tumor és petit, els tractaments locals acostumen a ser la primera maniobra terapèutica, acompanyats posteriorment per una teràpia complementària per a tractar la possible malaltia sistèmica residual.

Contràriament, quan la malaltia està localment avançada en el moment del diagnòstic, la quimioteràpia és el tractament més aconsellable, amb la finalitat de tractar com abans millor les possibles micrometàstasis que puguin existir.

### 6.5.1. RADIOTERÀPIA

La radioteràpia és un dels pilars fonamentals del tractament del càncer de mama, i té la finalitat de reduir l'índex de recaigudes. Consisteix en la utilització de radiacions ionitzants que, després de la intervenció quirúrgica, augmenten el període d'inactivitat de la malaltia, incrementant així la supervivència de les pacients. L'objectiu de la radioteràpia és destruir el màxim de cèl·lules canceroses preservant les cèl·lules no afectades i l'estructura i funció dels teixits i òrgans veïns.

La irradiació pot disminuir la mida d'un tumor abans de la cirurgia, o destruir cèl·lules tumorals que hagin quedat darrere la mama a la paret del tòrax o a l'axil·la després de la cirurgia.

Els seus efectes secundaris més freqüents són inflaments a la mama, canvis semblants a cremades pel sol a la zona tractada, i fatiga.

Els canvis que es poden presentar a la mama desapareixen entre 6 i 12 mesos després. En algunes dones, la mama es fa més petita i consistent després de la radioteràpia.

La braquiteràpia és un tipus de radioteràpia que consisteix en la col·locació de material radioactiu a la zona del tumor. Aquesta teràpia ofereix resultats més estètics que la resta de radioteràpies, ja que no s'irradia a la pell. Per aquest mateix motiu, produeix menys seqüeles cutànies i, en definitiva, permet augmentar la dosi de radiació, que implica un major control local del tumor. L'inconvenient que presenta és la necessitat d'implantar les agulles amb les fonts radioactives, ja que encara que s'utilitzi una anestèsia local, sempre suposa una molèstia per les pacients.

### 6.5.2. QUIMIOTERÀPIA

El tractament consisteix en l'administració de fàrmacs citostàtics, per via venosa, amb la intenció d'eliminar les cèl·lules tumorals que puguin haver-hi per tot el cos, complementant els tractaments locals de cirurgia i la radioteràpia. La quimioteràpia és una tècnica que utilitza diversos fàrmacs citostàtics de manera seqüencial, de manera que cada seqüència s'anomena cicle de tractament.

El tractament amb quimioteràpia sol començar entre 14 i 28 dies després de la intervenció quirúrgica, tant si també es fa radioteràpia com si no. Els efectes secundaris de la quimioteràpia depenen dels fàrmacs administrats a la pacient. Aquests fàrmacs són tòxics per a les cèl·lules tumorals, de manera que les destrueixen o eviten que es reproduïxin. Malgrat tot, també incideixen, tot i que d'una forma més lleu, a les cèl·lules normals.

En general, la quimioteràpia afecta les cèl·lules de divisió ràpida, com ara les cèl·lules sanguínies, els fol·licles dels pèls i les cèl·lules del tub digestiu. Per aquest motiu, els efectes secundaris més habituals són la

pèrdua de cabells, la disminució de la gana, les nàusees, els vòmits, les diarrees, les úlceres a la boca i les conjuntivitis. D'altra banda, la quimioteràpia pot alterar transitòriament el sentit del gust, i produir sensibilitat a les olors. A més a més, si la dona tractada té la regla, pot ser que se li retiri durant els mesos de tractament, o que fins i tot se li avanci la menopausa.

Un altre efecte secundari important pot ser la disminució dels glòbuls blancs de la sang, la qual cosa pot produir febre alta i una gran propensió a patir malalties infeccioses.

La major part d'aquests efectes són de curta durada, i actualment es poden controlar mitjançant medicació complementària.

### 6.5.3. TRACTAMENT HORMONAL

En condicions normals, les cèl·lules de la glàndula mamària pateixen diferents canvis a causa de les hormones, especialment els estrògens (desenvolupament a la pubertat, augment durant l'embaràs, secreció de llet durant la lactància). Alguns tumors originats en aquestes cèl·lules poden conservar la capacitat de respondre als canvis hormonals, deixant de créixer si les hormones que estimulen el seu desenvolupament se suprimeixen o si s'administren medicaments que contrarestin aquest efecte de creixement.

Hi ha diverses maneres de bloquejar l'efecte de l'estrogen o disminuir-ne els nivells. El fàrmac més utilitzat com antiestrogen és el tamoxifè, que es pren de forma diària en comprimits durant 5 anys aproximadament. Aquest antiestrogen, a més a més, ha demostrat reduir aproximadament un 50% el risc de recurrència de càncer de mama.

És un tractament generalment força tolerat. Malgrat tot, els efectes secundaris més comuns són semblants als de la menopausa: sufocacions, irregularitats en la menstruació i sequedat vaginal. A més a més, en casos excepcionals, el tamoxifè pot produir trastorns de la circulació venosa.

### 6.5.4. TRACTAMENT QUIRÚRGIC

El càncer de mama és, o pot ser, des del moment del seu diagnòstic, una malaltia generalitzada, per tant, l'objectiu del tractament quirúrgic consisteix a extirpar el tumor primari i tractar les vies de drenatge limfàtic en l'àmbit axil·lar.

Fa anys, es creia que era necessari realitzar cirurgies molt mutilants, extraient de l'organisme tota la glàndula mamària i la musculatura situada a sota d'aquesta. No obstant això, actualment s'ha demostrat que les cirurgies menys àmplies aconseguixen els mateixos resultats que les anteriors.

Hi ha dos tipus de procediments quirúrgics relacionats amb el càncer de mama:

- Tumorectomia: consisteix a extirpar únicament el tumor i un marge del teixit normal. Si les cèl·lules tumorals també tinguessin presència en aquest marge, possiblement seria necessària una nova intervenció per extirpar la resta del teixit cancerós.  
Aquest tractament sempre es complementa amb el buidament axil·lar i la radioteràpia, i només es duu a terme quan les característiques de l'extirpació permeten conservar el pit amb un volum i forma adequats, i sempre i quan es pugui assegurar al màxim la curació.
- Mastectomia simple: s'extirpa tota la mama, juntament amb el mugró i l'arèola, però sense treure cap gangli limfàtic axil·lar ni teixit muscular de sota el pit.
- Mastectomia radical modificada: s'extirpa tota la mama i alguns dels ganglis limfàtics axil·lars. És la intervenció més freqüent que es practica a les pacients a les quals se'ls ha d'extirpar tot el pit.
- Mastectomia radical (Halsted): no només s'extirpa tota la mama amb el mugró i l'arèola inclosos, sinó que també els ganglis limfàtics de l'axil·la i els músculs situats sota la mama. Actualment es duu a terme en rares ocasions.
- Limfadenectomia axil·lar: tant si es duu a terme una mastectomia radical, una mastectomia radical modificada o una tumorectomia, s'ha de saber si el càncer s'ha estès als ganglis limfàtics, lloc pel qual les cèl·lules tumorals entren a la circulació sanguínia i s'escampen per tot l'organisme, és a dir, s'ha de mirar si hi ha hagut metàstasi. Per a poder saber-ho, s'han d'extreure un mínim de 10 ganglis axil·lars durant la intervenció quirúrgica, procediment anomenat limfadenectomia o buidament axil·lar.  
En cas de realitzar una mastectomia, el buidament axil·lar es duu a terme a través de la incisió utilitzada per a l'extirpació de la mama, contràriament, es fa una incisió exclusiva per la limfadenectomia.  
Quan a una pacient se li practica una cirurgia limfàtica axil·lar pot experimentar insensibilitat, permanent o transitòria, de la pell de la part interna de l'extremitat superior, és a dir, de la zona de l'aixella. Aquesta cirurgia també pot limitar els moviments del braç i de l'espatlla. Tot i així, l'efecte secundari més freqüent i problemàtic de la cirurgia és l'anomenat limfedema.

El limfedema es defineix com una acumulació de limfa a la zona intersticial del braç i la mà, sobretot al greix subcutani, a causa d'un mal funcionament del sistema limfàtic, ja que s'han hagut d'extreure



els ganglis. Provoca un augment en el volum i el pes del braç, disminuint-ne la mobilitat. A vegades, aquests símptomes són precedits per una cel·lulitis a escala superficial, el braç augmenta de temperatura i envermelleix, causant dolor i febre. Actualment, no es pot saber quines pacients desenvoluparan aquesta situació ni quan, ja que es pot presentar immediatament després de la cirurgia, o pot trigar mesos i fins i tot anys en aparèixer. Tot i així, hi ha estudis que indiquen que després del buidament axil·lar, pot aparèixer un limfedema a l'extremitat superior homolateral entre un 60 i un 70% dels casos.

Una ràpida detecció del limfedema és fonamental per motius: el primer, és perquè el resultat del tractament depèn de la rapidesa amb què s'aplica, i el segon, per evitar que es formi una limfangitis (inflamació dels vasos limfàtics), ja que això empitjoraria el pronòstic del limfedema.

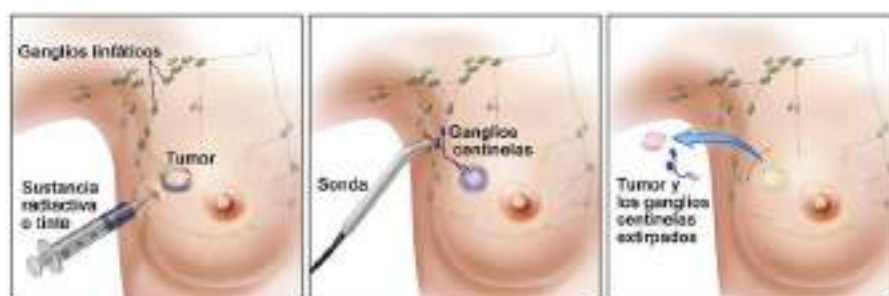
- Tècnica del gangli sentinella: fins fa relativament pocs anys, l'única manera de valorar l'estat dels ganglis limfàtics axil·lars era mitjançant la limfadenectomia. Actualment, però, per evitar el màxim possible el buidament axil·lar, i per tant els efectes secundaris que això comporta, s'ha desenvolupat la tècnica del gangli sentinella.

El gangli sentinella és el primer gangli que rep el drenatge limfàtic del tumor primari i, per tant, la presència o absència de cèl·lules canceroses en aquest gangli permet predir l'estat de la resta. En els casos que el resultat sigui negatiu, és a dir, que no hi hagi cèl·lules tumorals al gangli sentinella, es pot evitar limfadenectomia completa, ja que el càncer no ha adquirit la capacitat d'escampar-se cap als ganglis o altres òrgans.

La tècnica del gangli sentinella consisteix a injectar una substància radioactiva o un tint a l'àrea del voltant del tumor, de manera que els vasos limfàtics condueixin aquesta substància cap al gangli sentinella, per així poder localitzar-ne la posició. Fet això, durant l'operació quirúrgica, s'utilitza un dispositiu que detecta la radioactivitat o es busca el gangli tenyit per a poder extirpar-lo. Posteriorment, s'analitza amb un microscopi el gangli per a saber si aquest conté cèl·lules canceroses. Si el resultat és positiu, és a dir, que sí que en conté, aleshores s'haurà de dur a terme l'extirpació de més ganglis. Contràriament, si és negatiu, la pacient haurà evitat suprimir tots els ganglis juntament amb els efectes secundaris que això comporta.

Aquesta biòpsia, malgrat tot, també pot comportar alguns efectes secundaris. Com altres procediments quirúrgics, pot causar dolor durant un temps, inflors i morats a la zona de la cirurgia, i pot augmentar el risc de patir infeccions. A més a més, algunes pacients

poden presentar reaccions cutànies o al·lèrgiques al tint utilitzat en el procediment per a detectar el gangli. Un altre possible cas és el d'un resultat negatiu fals de la biòpsia, és a dir, que no es veuen cèl·lules canceroses en el gangli limfàtic sentinella encara que realment sí que n'hi ha i poden haver-se escampat cap a la resta de ganglis limfàtics de la zona o fins i tot cap a altres parts del cos. Això podria comportar la necessitat d'una segona intervenció quirúrgica en què s'hagin de treure més ganglis i fer un buidament axil·lar.



**Figura 9.** Esquema de les etapes de l'extirpació del tumor i de ganglis limfàtics. FONT: Instituto Nacional del Cáncer, cancer.gov

## RECERCA ESPECÍFICA SOBRE LA TÈCNICA DE L'OSNA

### 7. L'OSNA

La biòpsia de ganglis sentinella s'ha establert ràpidament com el procediment quirúrgic de referència a l'hora de detectar la metàstasi en pacients amb càncer de mama en una fase poc avançada. Fins ara, l'anàlisi intraoperatori convencional de gangli sentinella es duia a terme mitjançant una tècnica que consistia a congelar el gangli ràpidament, per a després, utilitzant un micròtom, poder tallar el teixit en capes molt primes que es poden examinar amb microscopi. És una tècnica molt ràpida que permet examinar la mostra durant la intervenció quirúrgica, però com que només es pot estudiar una petita porció del gangli sentinella, hi ha un risc considerable d'obtenir falsos negatius.

L'anàlisi OSNA (One Step Nucleic Acid Amplification, amplificació d'àcids nucleics en un sol pas), permet analitzar la totalitat del gangli limfàtic de forma intraoperatoria. A més disminueix la possibilitat d'obtenir falsos negatius, ja que és una tècnica quantitativa, no qualitativa. D'aquesta manera, és possible prendre una decisió clínica definitiva sense necessitat de realitzar una segona intervenció quirúrgica en cas que sigui necessària. Un article anomenat *Intraoperative assessment of sentinel lymph node by one-step nucleic acid amplification in breast cancer patients after neoadjuvant treatment reduces the need for a second surgery for axillary lymph node dissection* escrit pel Dr. Vicente Peg i nou autors més, que va ser presentat al Congrés Anual Americà d'Oncologia (American Society of Clinical Oncology) l'any 2015, i que serà recollit en un llibre anomenat "The Breast, Volume 31" que publicarà l'any 2017 l'editorial de llibres científics i de medicina Elsevier, conclou, després d'un estudi, que una anàlisi intraoperatoria del gangli utilitzant l'OSNA redueix en un 18,5% la necessitat d'una segona intervenció per a realitzar el buidament axil·lar en el cas que l'anàlisi doni un resultat positiu (64).

És una RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, reacció en cadena de la polimerasa amb transcriptasa inversa) diferent de les altres, ja que consta de 6 primers (en lloc dels 3 habituals), i fa el procés en 30 minuts en comptes d'entre 1 i 2 hores. A més a més, no necessita l'extracció o purificació del mRNA, i pot avaluar un màxim de quatre ganglis limfàtics sentinella alhora, encara que això comporti un augment en el temps total necessari per obtenir els resultats. Comporta un resultat quantitatiu, no subjecte a les diferències que es puguin observar en les diferents seccions del gangli en el microscopi del patòleg. A més a més, és una eina completa, ja que segons el resultat que doni, tothom pot prendre decisions: el cirurgià a la intervenció quirúrgica, que decidirà si fer buidament axil·lar o no; l'oncòleg radioteràpic, que determinarà com ha de ser el tractament, amb més o menys

irradiació; i l'oncòleg mèdic, que deliberarà si cal fer un tractament de quimioteràpia o no, i en cas que sí, decidirà quin és el més convenient.

Es basa en l'amplificació d'àcids nucleics per a detectar el grau d'expressió (nombre de còpies de RNAm) del gen que codifica per a la citoqueratina 19 (CK19), ja que quasi tots els carcinomes de mama expressen aquesta proteïna. El gen encarregat de sintetitzar-la és el KRT19 (situat al cromosoma 17), que a causa de la seva alta sensibilitat, és el marcador més utilitzat per a detectar cèl·lules tumorals, mitjançant una RT-PCR, en els ganglis limfàtics, la sang perifèrica i la medul·la òssia de pacients amb càncer de mama.

Malgrat tot, entre un 1 i un 2% dels casos, no s'expressa aquest gen, de manera que no es podrà realitzar aquesta anàlisi, ja que els resultats podrien no ser certs (55).

Aquesta amplificació d'àcids nucleics es duu a terme mitjançant un procediment isotèrmic, específic i sensible anomenat RT-LAMP (Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification, amplificació isotèrmica mitjançant bucles amb transcriptasa inversa), una tècnica desenvolupada per l'empresa Sysmex (veure annex 1), que fa una transcripció inversa de mRNA, i amplifica el DNAC sense purificar-lo prèviament a 65 °C en tan sols 16 minuts per cada mostra.

## 7.1. APLICACIONS DE L'OSNA

En el càncer de mama, l'OSNA s'utilitza per a detectar amb total seguretat si hi ha hagut o no metàstasi del tumor cap a altres zones de l'organisme analitzant el gangli limfàtic sentinella. Aquest procediment, però, no només s'utilitza en el càncer de mama, sinó que també es pot aplicar en altres tipus de càncer.

Malauradament, però, no es pot utilitzar en qualsevol càncer, ja que s'han de donar un seguit de condicions.

En primer lloc, el conjunt de ganglis més proper al càncer primari ha de tenir o bé un sol gangli sentinella, o un nombre reduït d'aquests. Per contra, si n'hi ha molts, pot acabar passant el que precisament és una de les coses que l'OSNA pretén evitar: les limfadenectomies.

D'altra banda, també s'ha de donar el cas que les cèl·lules canceroses expressin tan sols un gen diferent que la resta de cèl·lules del mateix tipus. En el cas del càncer de mama, per exemple, aquest gen és el CK19. Si el càncer expressa més d'un gen, ja no es pot fer l'anàlisi de l'OSNA, ja que aquesta tècnica el que fa és mesurar el nombre de còpies d'un sol gen que hi ha en la mostra.

Actualment, els dos altres càncers, a banda del càncer de mama, en els quals també s'utilitza la tècnica de l'OSNA són el càncer de còlon, i el càncer gàstric.

El càncer de còlon, en bona part dels casos, està molt lligat a una mutació del gen APC (situat al cromosoma 5), que codifica per una proteïna homònima. Perquè es desenvolupi el càncer a causa d'aquest gen, ambdós al·lels han de ser mutants.

L'ús de la tècnica de l'OSNA en aquest tipus de càncer és un tema una mica controvertit. Hi ha hospitals que creuen en la presència d'un gangli sentinella per on es propagaria el càncer i, per tant, utilitzen l'OSNA amb la mateixa finalitat amb la qual s'utilitza en el càncer de mama sempre que no estigui massa desenvolupat. D'altra banda, fins i tot hospitals que no creuen en la presència d'aquest gangli sentinella, ja que no hi ha prou estudis que ho demostrin, l'utilitzen per estudiar, és a dir, analitzar tots els ganglis. En ser una tècnica més precisa, es pot dir en quin estadi de la malaltia es troba el pacient d'una manera més acurada.

El càncer gàstric és l'altre tipus de càncer amb el qual també s'utilitza la tècnica de l'OSNA. Tot i així, només s'utilitza en països orientals, sobretot al Japó, ja que el càncer gàstric és més comú que en països occidentals, on és molt poc freqüent. Malgrat que no se'n sàpiguem del tot els motius, es creu que aquest fet és degut a la dieta de cada zona. S'ha pogut observar que en països com els Estats Units d'Amèrica, el nombre de casos de càncer gàstric han disminuït considerablement en els darrers anys, i hi ha estudis que indiquen que és a causa de la disminució d'aliments curats, salats i fumats. A banda d'això, una dieta baixa en verdures i fruites fresques també és considerada un factor de risc.

Els casos de càncer gàstric en països occidentals es detecten sovint en estadis massa avançats per utilitzar l'OSNA per a analitzar només el gangli sentinella. Tot i així, sí que s'utilitza per estudiar i així poder saber com de desenvolupat i estès està el tumor. Al Japó i altres països orientals, però, sí que s'utilitza la tècnica per analitzar tan sols el gangli sentinella, ja que al ser més habitual, se sol detectar quan la malaltia no està tan desenvolupada.

A més a més, un article presentat al Congrés Anual de l'American Society of Clinical Oncology (ASCO), exposa que l'OSNA es podria utilitzar també per a detectar metàstasis als ganglis sentinella del coll i del cap quan hi ha un tumor en una d'aquestes dues zones (65). Aquesta aplicació de la tècnica, però, encara està en fase de recerca, és a dir, encara no té l'aprovació legal mínima per fer-se servir com a rutina.

Actualment hi ha diversos estudis que pretenen buscar la manera d'utilitzar l'OSNA per a diagnosticar la metàstasi en altres tipus de càncer, com per exemple en el càncer de vulva i el càncer de tiroide. Ambdós estudis estan obtenint bons resultats, tot i que encara els queda molt camí per recórrer.

## 8. REALITZACIÓ D'UNA ANÀLISI D'OSNA

Per a saber exactament com funciona la tècnica de l'OSNA, vaig posar-me en contacte amb el departament de càncer de mama de l'Hospital del Mar de Barcelona a través de la germana del meu pare, que és infermera en aquest hospital, i des de fa anys està en el departament de càncer de mama i en la unitat de prevenció d'aquest mateix tipus de càncer. Després de parlar amb ells, em van oferir la possibilitat d'anar-hi un dia i, juntament amb alguns estudiants de la carrera de medicina, veure com duïen a terme una anàlisi d'OSNA. A banda d'això, també vaig tenir l'oportunitat de poder parlar amb el Dr. Corominas, el metge en cap de la unitat de càncer de mama del mateix hospital, i professor de medicina, que em va poder explicar quin era el mètode convencional que utilitzaven abans d'implantar la tècnica de l'OSNA, i els avantatges que aquesta última ofería envers l'anterior. D'aquesta manera, vaig poder veure de mà dels professionals d'un hospital de primera línia el procediment que s'ha de dur a terme per a realitzar una anàlisi d'OSNA.

D'altra banda, em vaig posar en contacte amb la Dra. Cristina Sans de l'empresa Sysmex, una de les principals empreses de diagnòstic mèdic d'Europa, líder mundial en matèria de diagnòstic i serveis d'hematologia, i que se centra a investigar per tal de millorar el diagnòstic del càncer, tot introduint al mercat diverses tècniques creades per la mateixa empresa. És aquesta empresa la que ha creat i desenvolupat la tècnica de l'OSNA, que cada cop està més estesa i més hospitals l'utilitzen com a sistema habitual per a l'anàlisi dels ganglis sentinella.

Ella em va explicar en què consistia l'OSNA, i em va proposar d'anar un dia als laboratoris de l'empresa a Sant Just Desvern per tal de poder realitzar jo mateixa, de primera mà i amb l'ajuda d'una professional una anàlisi d'OSNA, veure'n el procediment, el material, els protocols, i analitzar els resultats obtinguts.

A continuació, descriuré el procediment que s'ha de seguir per a poder dur a terme una anàlisi d'OSNA, explicant detalladament en què consisteix cada pas, quin material es necessita, i quins paràmetres s'utilitzen per a poder-ne determinar els resultats.



**Figures 10 i 11.** Jo, fent l'anàlisi d'OSNA als laboratoris de l'empresa Sysmex

## 8.1. EQUIPAMENT, MATERIAL I REACTIUS

### - EQUIPAMENT I MATERIAL

- Guants de nitril (sense pols)
- Balança de precisió
- Bisturí
- Politron® (aparell que serveix per homogeneïtzar diferents tipus de material, en aquest cas, el gangli sentinella juntament amb el Lynorhag)
- Pala Lynoprep per al *Politron*®<sup>1</sup>
- Tub Lynoprep<sup>1</sup>
- Tubs Eppendorf d'1,5 ml (tub de microcentrífuga)
- Tubs amb tap de rosca transparents i roses
- Pipetes de precisió
- Puntetes de Pipetes
- *Rack* de plàstic<sup>1</sup>
- *Rack* metàl·lic<sup>1</sup>
- Centrífuga
- Vòrtex
- Aparell RT-100i<sup>1</sup>

### - REACTIUS

- Kit Lynoamp BC<sup>1</sup>
  - *Primers* (reactiu d'amplificació)
  - Enzims (reactiu d'amplificació)
  - Calibradors (C1, C2 i C3)
  - Controls (positiu PC i negatiu NC)

\*Cada un d'aquests reactius es pot descongelar un màxim de 5 cops.

- Cèl·lules de detecció<sup>1</sup>
- *Lynorhag*®<sup>1</sup> (Reactiu d'homogeneïtzació que estabilitza les molècules de mRNA i les protegeix de l'acció de les ribonucleases, de manera que ajuda a disgregar i preservar l'ARN obtingut del gangli sentinella)

<sup>1</sup>Material i reactius que vénen donats per la mateixa empresa Sysmex ja preparats, amb les concentracions necessàries.

## 8.2. REALITZACIÓ DE LA TÈCNICA

### 8.2.1. RECEPCIÓ DE LA MOSTRA

Aquest apartat descriu com és la recepció del gangli a l'Hospital del Mar de Barcelona, per a poder explicar tot el procediment complet, ja que quan vaig fer jo l'anàlisi a l'empresa Sysmex, l'objecte a analitzar ja era allà.

Quan arriba el gangli sentinella, des del departament d'Anatomia Patològica de l'hospital, es truca tant al patòleg com als tècnics avisant-los que ja hi ha el gangli, per així començar a treballar com més aviat millor.

Un cop el patòleg té el gangli, conjuntament amb els tècnics extreu tot el greix que l'envolta i el pesen en una balança de precisió, utilitzant sempre guants protectors. El gangli no ha de pesar més de 0,6 g, de manera que si és així, s'haurà de dividir tants cops com sigui necessari amb un bisturí.

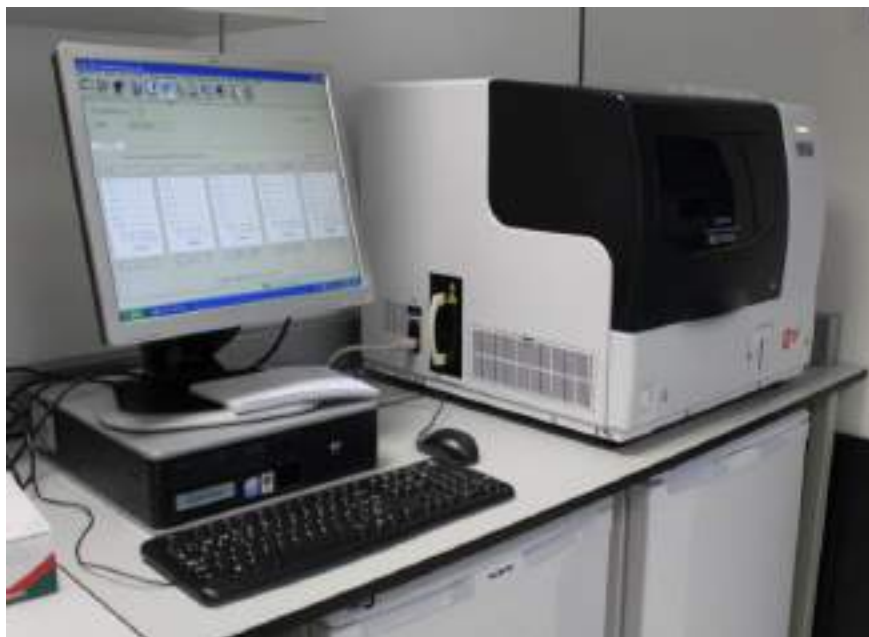
Tot seguit, s'ha de congelar el gangli en un criotub a -80 °C.

Durant la realització de la meva anàlisi a l'empresa Sysmex, a causa de la meva inexperiència en l'àmbit i per temes de seguretat, ja que només els professionals disposen de ganglis reals per a dur a terme les anàlisis i no és quelcom a l'abast de qualsevol, vam utilitzar una mostra d'origen animal amb una composició molt similar als ganglis humans.

### 8.2.2. POSADA EN MARXA DE L'EQUIP

Per a començar el calibratge de l'aparell, primer de tot s'ha d'engegar el programa d'ordinador que controla l'aparell i entrar-hi amb el nom d'usuari. Tot seguit, s'ha de comprovar que les parts més importants estiguin correctament: que la bossa de desfets sigui nova i estigui col·locada al seu lloc, que les caixes de puntes de pipeta estiguin col·locades (es canvien únicament quan una caixa està buida), i assegurar-se que no hi hagi cap cèl·lula de detecció a l'equip.





**Figura 12.** Equip RD-100i i ordinador amb el programa que controla l'analitzador

Seguidament, és fonamental comprovar que les unitats que queden de *primers* i d'enzims siguin les suficients per a fer el calibratge i l'anàlisi de les mostres. Si no fos així, s'haurà de clicar el botó que posa "Sustituir frasco" situat o bé a l'apartat de *Primers*, o al d'enzims, depenent del que s'hagi de canviar.

Per a saber quines són les quantitats necessàries de cada reactiu per a dur a terme l'anàlisi de la mostra, ens fixem en la taula següent:

	Curva estándar	1 Muestra	2 Muestras	3 Muestras	4 Muestras
<b>Cubetas de detección</b>	3	2	3	4	5
<b>Puntas de pipetas</b>	3 filas	2 filas	3 filas	4 filas	5 filas
<b>Primers (20µl/test)</b>	6 unidades	4 unidades	6 unidades	8 unidades	10 unidades
<b>Enzima (3 µl/test)</b>	6 unidades	4 unidades	6 unidades	8 unidades	10 unidades

**Taula 1.** Nombre de reactius necessaris per a dur a terme la corba estàndard i fins a 4 mostres. FONT: RD-100 Guía del curso de formación, Sysmex

Si passen més de dues hores, s'haurà de tornar a calibrar l'aparell.

### 8.2.3. PREPARACIÓ DELS REACTIUS LYNOAMP

Primerament, s'han de preparar tots els reactius necessaris per a realitzar la corba estàndard. Aquests, situats en un *rack* metàl·lic, hauran estat prèviament congelats a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  per tal d'afavorir-ne la conservació. A l'hora de començar l'anàlisi, però, primer els hem de treure del congelador.

Tant els reactius calibradors (C1, C2 i C3), com els controls (positiu PC i negatiu NC) i els *primers*, s'hauran de descongelar, cosa que no es farà amb l'enzim. Per tant, es col·loca l'enzim en un *rack* metàl·lic que en conserva la temperatura, mentre que la resta de reactius es posen en un *rack* de plàstic a temperatura ambient.



**Figura 13.** Reactius situats al *rack* de plàstic i enzim col·locat al *rack* metàl·lic

Un cop descongelats, els tubs que contenen els *primers*, els controls positiu i negatiu i els tres calibradors hauran de ser vortejats amb el vòrtex durant 15 segons cada un. L'enzim, en canvi, es barrejarà invertint el tub 10 vegades sense que es formin bombolles en el líquid de l'interior.

Ja fet, es col·locaran tots els reactius, incloent-hi l'enzim, a la centrífuga, on se centrifugaran durant també 15 segons a 12000 revolucions per minut (rpm).



**Figura 14.** Vòrtex



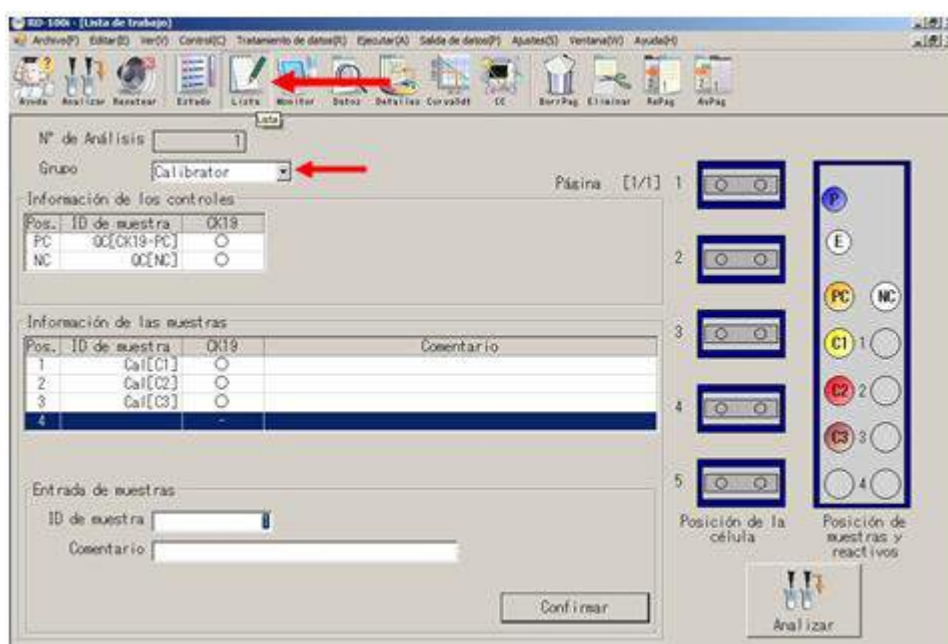
**Figura 15.** Centrífuga

Un cop acabat aquest procés, s'hauran de posar els reactius a l'equip si l'anàlisi es vol fer abans de 15 minuts. Contràriament, es col·locaran al rack metàl·lic.

Si al cap de 30 minuts encara no s'han utilitzat, s'haurà de tornar a vortejar i centrifugar els reactius.

#### 8.2.4. CALIBRACIÓ DE LA CORBA ESTÀNDARD

Primerament, s'ha de registrar l'anàlisi en la llista de treball del programa que controla l'equip, tot clicant a la pestanya on posa "Lista".



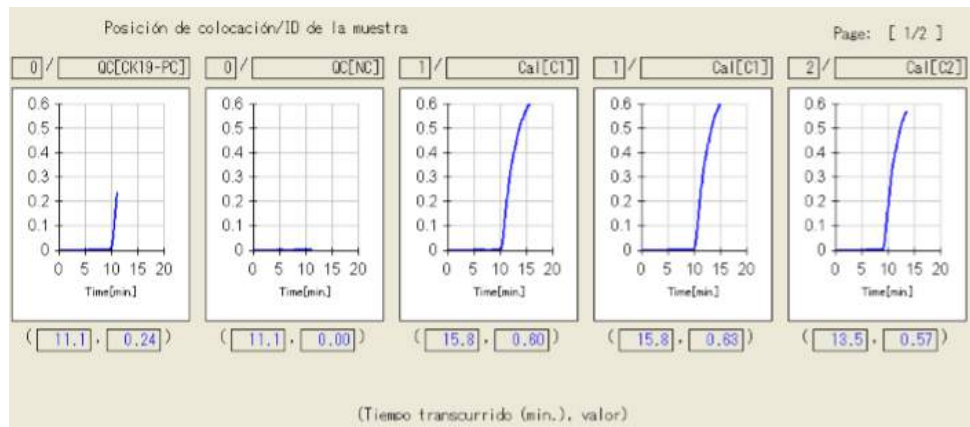
**Figura 16.** Pantalla del programa on es mostra el botó "Lista", l'opció "Calibrador" i la resta de pestanyes disponibles

Tot seguit, es col·loquen els tres tubs amb les cèl·lules de detecció necessàries a l'equip. Aquestes cèl·lules vénen ja preparades per l'empresa Sysmex. Un cop aquestes són posades al seu lloc, a l'esquema de la pantalla, els rectangles de color vermell apareixeran de color verd, indicant així que les cèl·lules de detecció estan ben posades i que l'equip les ha detectat.

A continuació, es col·locarà cada reactiu en la seva corresponent unitat, seguint el codi de colors situat a l'esquerra de la pantalla. Un cop fet, es clica el botó "Analizar". A la pestanya "Monitor", es pot veure el transcurs de l'anàlisi a temps real. Quan l'anàlisi acaba, s'ha de validar la corba estàndard, a partir de la qual, més tard, compararem els resultats obtinguts amb el gangli amb els resultats d'aquesta corba.

La corba estàndard mesura el temps que triga l'equip a detectar un valor de 0,1 de terbolesa en les mostres (*Risetime*). L'equip mesura la terbolesa d'un

subproducte (Pirofosfat de magnesi,  $Mg_2P_2O_7$ ) de la replicació del DNA, ja que durant aquest procés, s'allibera aquesta molècula, que queda en forma de partícula en suspensió en la solució. Un alt nivell de terbolesa indica una major quantitat de  $Mg_2P_2O_7$ , fet que, al seu torn, significa que hi ha un gran nombre de mRNA de CK19 a la mostra i, per tant, un elevat nombre de cèl·lules canceroses.



**Figura 17.** Pantalla amb els *Risetimes* dels controls i els calibradors

Per a validar la corba estàndard, s'ha d'anar a la pantalla "Datos" i comprovar una sèrie de valors:

- *Risetime* de PC és entre 8 i 12 minuts
- *Risetime* de NC és ND (no detectat)
- Que hi hagi una diferència entre les dues mesures de C1 de  $\leq 0.8$
- *Risetime* de C1, C2 i C3  $\rightarrow 6 \text{ minuts} < C3 < C2 < C1 < 13 \text{ minuts}$
- Pendent  $\geq -2,3$

Si els valors són correctes, es canvia a la pantalla "CurvaStd", es clica "Actualizar", i seguidament a "Aplicar nueva curva". En cas contrari, s'hauria de tornar a repetir tot el procés de calibratge.

### 8.2.5. PREPARACIÓ I ANÀLISI DE LES MOSTRES

Per a començar la preparació del gangli (en el nostre cas no és un gangli real, sinó una mostra animal), comencem afegint 4 ml de *Lynorhag*<sup>®</sup> i la mostra al tub Lynoprep. Seguidament, es tritura la mostra amb el *Politron*<sup>®</sup> i amb la pala Lynoprep durant 60 segons a 12200 rpm, de manera que quedi una mescla homogènia. Un cop obtinguda, es traspasa 1 ml del triturat a un tub Eppendorf, i se centrifuga el tub durant 60 segons a 12200 rpm. Aquest darrer pas es fa dues vegades, amb dos tubs Eppendorf diferents, per a així tenir una solució de "seguretat".

Un cop centrifugat, es pot observar que s'han format dues fases, una a la superfície de la solució, i l'altra a la resta de tub. Es traspassen 500  $\mu$ l de la

fase del centre a un altre tub Eppendorf, vigilant no agafar solució de la fase superficial. Aquest últim pas es fa amb els dos tubs Eppendorf iguals que havíem preparat anteriorment. A partir d'aquí, un dels tubs s'emmagatzemarà a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Dels  $500\text{ }\mu\text{l}$  del tub restant, se'n traspassen  $20\text{ }\mu\text{l}$  a un tub de tap de rosca que contingui  $180\text{ }\mu\text{l}$  de *Lynorhag*®, d'aquesta manera, obtenim la mostra directa de l'anàlisi. Aquesta mostra s'haurà de vortejar durant 5 segons.

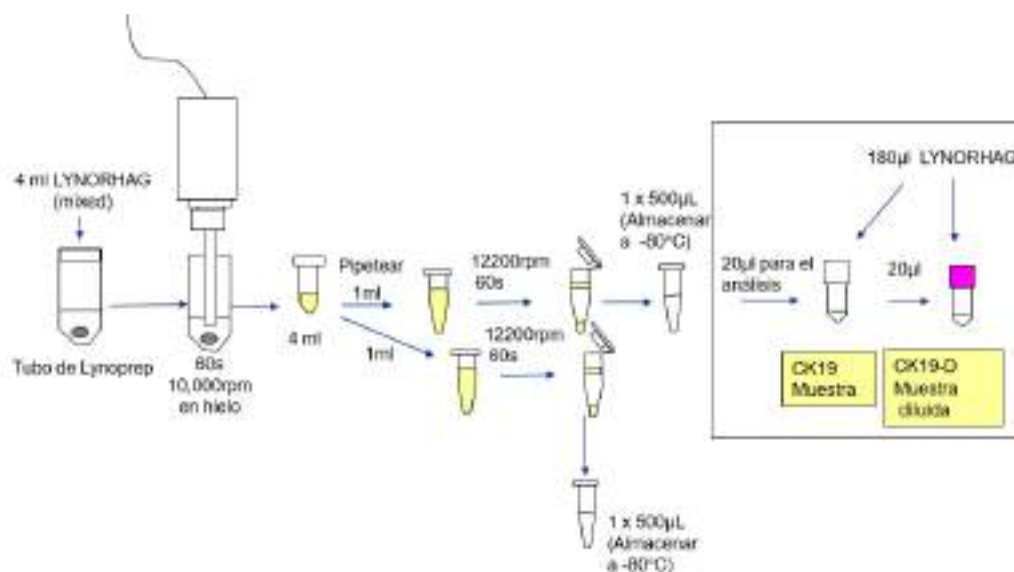


**Figura 18.** Tub Eppendorf on s'hi poden diferenciar les dues fases formades

Finalment, s'extreuen  $20\text{ }\mu\text{l}$  de la barreja anterior i es dipositen a un tub de tap de rosca de color rosa que contingui  $180\text{ }\mu\text{l}$  de *Lynorhag*®. D'aquesta manera, s'obté una mostra diluïda. Un cop obtinguda, es vortegen tant la mostra directa com la diluïda durant 10 segons, i se centrifuguen durant 15 segons.



**Figura 19.** Centrifuga amb la mostra directa i la diluïda a l'interior



**Figura 20.** Esquema de la preparació de les mostres, tant la directa com la concentrada.  
FONT: Sysmex

La mostra directa es col·locarà a l'equip a la posició on posa *Sample* (S), mentre que la mostra diluïda es posarà on hi ha una D. Seguint el mateix patró, on posa P hi haurà els *primers*, a la E l'enzim, al PC el control positiu, i al NC, el negatiu.

Per a registrar la mostra introduïda a l'equip, s'haurà d'anar a la pestanya "Lista", clicar a "Grupo", i seleccionar l'opció "Sample". Tot seguit, es registren les mostres a "ID de muestra", i es clica el botó "Confirmar". Quan això ja està fet, es clica a "Analizar". Aquesta anàlisi, com l'anterior, també és a temps real, de manera que anant a la mateixa pestanya es podrà veure com es formen les corbes.

## 8.2.6. RESULTATS

Per a poder veure els resultats un cop ha acabat l'anàlisi, s'ha d'anar a la pantalla "Datos".

Per a assegurar que l'equip ha fet correctament l'anàlisi, s'ha de confirmar que el *Risetime* del NC és ND i que el del PC estigui entre 8 i 12 minuts. Un cop comprovat això, s'han de seleccionar el calibratge corresponent i la mostra. Per a obtenir el full de resultats, es clica a "Salida de datos" i a "Impresión por bloques", i es crea un arxiu PDF amb els resultats de la nostra anàlisi.

Els resultats que vam obtenir van ser els següents:

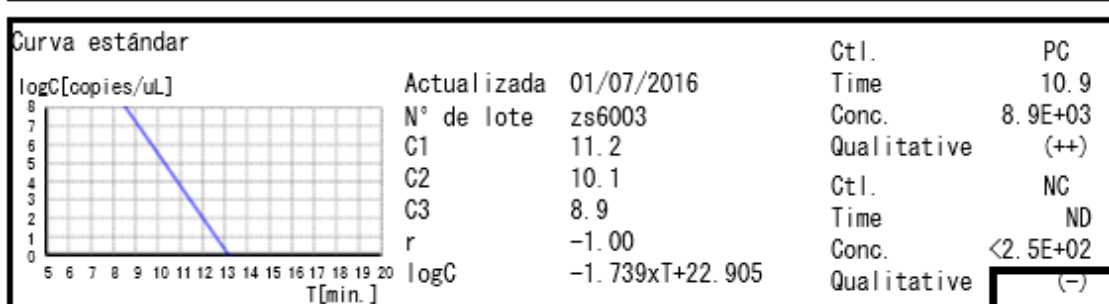
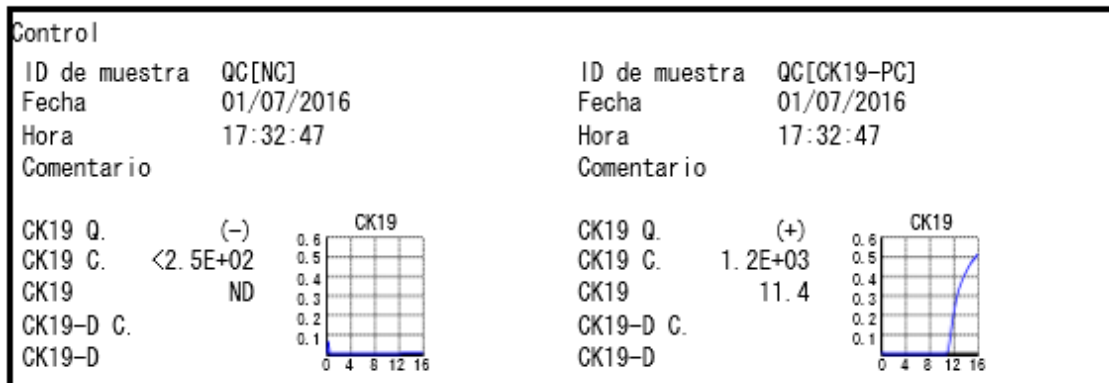
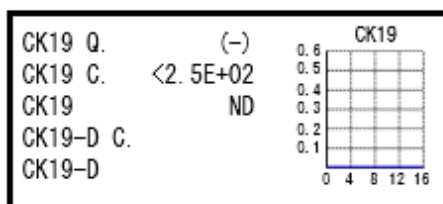
Nº de Anàlisis 2

Sysmex RD-100i RD-100i/11088 00-20

Nombre del centro : ONKOLOGIKOA  
 Departamento / Servicio : ANATOMIA PATOLOGICA  
 Responsable : DR. REZOLA  
 Operador :

Resultado

ID de muestra joana  
 Fecha 01/07/2016  
 Hora 17:30:47  
 Comentario



Un cop creat l'arxiu, arriba el moment de valorar-ne els resultats per tal de determinar si hi ha o no cèl·lules tumorals a la mostra i, en cas afirmatiu, poder concretar si es tracta d'una micrometàstasi o d'una macrometàstasi.

Com s'ha dit anteriorment, la citoqueratina 19 (CK19) és un marcador de cèl·lules epitelials que en condicions normals no s'expressa en el teixit limfàtic. La presència de mRNA de CK19 es correspon amb la mida de la metàstasi present en el gangli sentinella. L'avaluació del resultat de la pacient es basa en la corba estàndard calculada a l'inici de l'anàlisi, on s'utilitzen tres calibradors amb diferents concentracions conegudes de mRNA de CK19, i es compara

amb la corba obtinguda després de l'anàlisi de les mostres. El resultat es valora de la següent manera:

- Nombre de còpies de CK19 igual o major de  $5 \cdot 10^3$  → Macrometàstasi (++)
- Nombre de còpies de CK19 igual o major de  $2,5 \cdot 10^2$  però menor de  $5 \cdot 10^3$  → Micrometàstasi (+)
- Nombre de còpies de CK19 menor de  $2,5 \cdot 10^2$  → No hi ha metàstasi (-)

En el full de resultats, aquest es pot veure en el primer rectangle. Primer es pot veure el resultat qualitatiu (-, +, ++). A sota, hi ha el resultat quantitatiu, que dóna el nombre de còpies de CK19 que s'han trobat a la mostra, i seguidament, el valor del *Risetíme*. En el nostre cas, vam veure com la mostra animal que havíem analitzat tenia un valor de còpies de CK19 menor de  $2,5 \cdot 10^2$ , i que per tant, la mostra no tenia cèl·lules tumorals que haguessin metastatitzat.

### 8.2.7. NETEJA DE L'EQUIP

Ja per finalitzar l'anàlisi, és necessari deixar-ho tot correctament al seu lloc, extreure tots els reactius de l'equip, i llençar els residus. Per això, s'han de fer un seguit de passos.

Primerament, s'ha de retirar la bossa de residus de l'equip. Després, s'extreuen les cèl·lules de detecció, que es dipositaran a la bossa de residus que s'ha tret prèviament, i els tubs de les mostres es tanquen i es dipositen també a la bossa. Aquesta bossa es llença al contenidor corresponent seguint els protocols de cada laboratori. Tot seguit, se'n col·loca una de nova al seu lloc.

Un cop fet, es retiren els tubs dels controls i els reactius, es tanquen, i es posen en el *rack* envoltat de gel si s'han de tornar a fer servir però no immediatament, o bé es guarden a  $-20$  °C si ja es donen per finalitzades les anàlisis del dia. Seguidament es col·loca la tapa sobre els *racks* de puntes de pipetes.

Quan ja s'hagin realitzat totes les anàlisis del dia, s'haurà d'apagar el sistema, anant a la pestanya "Control" i clicant a "Desconexión del equipo" per a apagar l'equip, i clicant a "Archivo" i "Salir" per a apagar el programa.



## 9. DISCUSSIÓ

En els darrers apartats he pogut entendre en què consisteix l'OSNA: és una tècnica de diagnòstic de metàstasi del càncer en els ganglis limfàtics. És una RT-PCR que mesura el grau d'expressió d'un gen. Depenent d'aquest valor, es conclou si el gangli té cèl·lules afectades o no i, en cas que sí, la tècnica especifica si es tracta d'una macrometàstasi o d'una micrometàstasi.

He après, també, quina és la metodologia de treball en un laboratori i els passos a seguir per a realitzar una anàlisi d'OSNA correctament, i n'he pogut interpretar els resultats per acabar determinant si la mostra utilitzada contenia o no cèl·lules canceroses.

L'empresa Sysmex ven el seu producte indicant els avantatges que ofereix la seva tècnica respecte a la histologia. De forma sintetitzada, aquestes són les característiques que aporta l'OSNA segons el punt de vista de la mateixa empresa.

<b>CARACTERÍSTIQUES DE L'OSNA PER DAMUNT DE LA HISTOLOGIA SEGONS L'EMPRESA SYSMEX</b>		
	<b>HISTOLOGIA</b>	<b>ANÀLISI D'OSNA</b>
Necessitat de fer una limfadenectomia	Només si el resultat és positiu	Només si el resultat és positiu
Tipus d'anàlisi	Extraoperatori	Intraoperatori
Necessitat de dur a terme una segona intervenció	Només si el resultat és positiu	No
Possibilitat d'obtenir falsos negatius	Sí (8.3% dels resultats negatius)	No
Valoració de la mostra	Pot variar una mica depenent de qui ho mira	Valor numèric, exacte i objectiu
Temps que es triga en fer l'anàlisi	1 - 2 hores aprox.	30 minuts aprox.
Cost	Assequible	Elevat
Temps intraoperatori	Extracció del gangli	Extracció del gangli + Realitzar anàlisi + Presa de decisió segons el resultat

**Taula 2.** Característiques de l'OSNA respecte la histologia segons l'empresa Sysmex.

Que sigui el punt de vista de l'empresa, però, no vol dir que les dades siguin falses, sinó que, en ser l'empresa promotora, no té en compte els arguments que valoren els hospitals a l'hora de decidir si utilitzar-la o no. Malgrat tot, els hospitals això s'ho plantegen igualment, i es miren les dues tècniques des d'un punt de vista crític.

## 10. VALORACIÓ DE L'OSNA: PUNTS DE VISTA

Fins ara hem pogut veure el punt de vista de l'empresa Sysmex cap el seu propi producte. Tot i així, cal ser crítics. Els arguments de l'empresa promotora de la tècnica seran sempre beneficiosos per a aquesta, però a l'hora de posar-la en pràctica, els hospitals necessiten comparar la nova tècnica amb la que estan acostumats a utilitzar, i necessiten valorar si els beneficis que els aporta una solució en les mancances de l'altra o si, per contra, presenta nous problemes o no en soluciona cap dels anteriors. A causa de ser una tècnica molt recent, les discrepàncies entre hospitals cap a la utilitat de l'OSNA són molt decisives a l'hora d'implementar o no aquesta tècnica, doncs cada doctor entès en la matèria donarà arguments o bé a favor o bé en contra d'utilitzar-la.

Actualment, aquesta tècnica és tan nova que encara hi ha molta controvèrsia dins el mateix món de la medicina a l'hora de determinar la seva utilitat. Per a poder valorar-la, tenint en compte que no dispo dels coneixements mèdics necessaris per a fer-ho, m'he adreçat a diversos professionals per a saber el seu punt de vista envers l'OSNA.

### 10.1. FONTS

Per a conèixer els diferents punts de vista, vaig comptar, des d'un inici, amb l'ajuda de la germana del meu pare, l'Imma Collet Diví, infermera de la Unitat de Càncer de Mama de l'Hospital del Mar de Barcelona, i del Dr. Josep M<sup>a</sup> Corominas, cap de la Unitat de Càncer de Mama del mateix centre. Una visita a l'hospital per a parlar amb el doctor em va permetre conèixer de primera mà el punt de vista respecte a l'OSNA que tenen tant els oncòlegs com els radiòlegs que treballen amb el càncer de mama en aquest hospital.

Des de l'Hospital del Mar, em van explicar també que l'Hospital Universitari Vall d'Hebron de Barcelona ha passat d'analitzar els ganglis amb el microscopi a utilitzar la tècnica de l'OSNA. Per aquest motiu, em vaig posar en contacte amb aquest hospital, i vaig parlar amb la Dra. Cristina Saura i el Dr. Vicente Peg, tots dos professionals de la Unitat de Mama, que em van argumentar els motius que els havien portat a utilitzar l'OSNA.

Paral·lelament, buscant articles científics que em donessin més informació sobre l'OSNA, em vaig acabar posant en contacte amb el Dr. Gábor Cserni, de la Universitat de Szeged, Hongria. Aquest, a banda de proporcionar-me articles seus que tracten de l'OSNA, també em va donar els motius que van portar al seu hospital a prendre una decisió definitiva respecte a aquesta nova tècnica.

Finalment, vaig trobar una notícia publicada al diari ABC d'Austràlia (66) que parlava sobre l'OSNA i explicava els beneficis que aportava al diagnòstic i tractament del càncer de mama segons el Dr. Owen Ung i el Dr. Sunil Lakhani, professors de la Universitat de Medicina de Queensland.

A continuació s'exposen aquests quatre punts de vista diferents, explicant en cada cas els motius pels quals cada hospital ha decidit utilitzar l'OSNA o continuar amb la biòpsia tradicional (histologia).

## 10.2. RESULTATS

### 10.2.1. DR. GÁBOR CSERNI



El Dr. Cserni és professor de medicina de la Universitat de Szegeed, a Hongria. Ell és contrari a utilitzar l'OSNA, ja que posa en dubte si és realment aporta beneficis. El mètode tradicional té un alt grau de sensibilitat (un 95%) a l'hora de detectar macrometàstasis. Tenint en compte que en molts hospitals els cirurgians i els oncòlegs no solen actuar davant de micrometàstasis, el Dr. Cserni remarca que no és necessari detectar aquest últim tipus de metàstasi, tot i que reconeix que a l'hora de detectar les metàstasis més petites, l'OSNA és la tècnica més fiable. A més a més, explica que l'ús del microscopi per a detectar les possibles metàstasis, que és quasi tan bo com l'OSNA, és més assequible econòmicament. Per això creu que tan sols mirant-ho des del punt econòmic també acaba sent preferible no implementar aquesta nova tècnica, ja que suposa un cost addicional que no es veu compensat amb el nombre de pacients que realment hi guanyen al utilitzar-la. D'altra banda, apunta que també hi intervé un factor basat en les preferències a l'hora de treballar de cada metge. Ell prefereix utilitzar el microscopi, que és al que està més acostumat i creu innecessari aplicar un altre mètode si veu que aporta molt pocs beneficis envers l'anterior. Creu que cap estudi molecular hauria de dur-se a terme sense una verificació en l'àmbit microscòpic, de manera que aquest tipus d'anàlisi s'hauria de fer sempre. Aquests són els motius pels quals l'Hospital Universitari del Comtat Bács-Kiskun va optar per no implantar aquesta tècnica, ja que l'anterior ja els va prou bé i no troben suficients avantatges a l'OSNA per a utilitzar-la.

### 10.2.2. DR. COROMINAS, DE L'EQUIP D'ONCOLOGIA I RADIOLOGIA DE L'HOSPITAL DEL MAR DE BARCELONA



A l'Hospital del Mar de Barcelona, per motius molt similars als explicats anteriorment pel Dr. Cserni, els oncòlegs i cirurgians van optar per no utilitzar l'OSNA, ja que no ho consideraven necessari tenint en compte que l'observació dels ganglis sentinella amb microscopi ja els donava la informació necessària.

Tot i així, des del departament de radiologia del mateix hospital actualment s'està treballant en un estudi per saber si els valors donats per l'anàlisi d'OSNA també es poden utilitzar per a determinar el grau de radiació i el tipus de tractament que s'hagi d'aplicar a la pacient.

Aquest ús alternatiu de la tècnica l'exposa l'empresa Sysmex a l'hora d'explicar els beneficis de l'OSNA. De tota manera, des de l'hospital han decidit fer-ne un estudi propi per poder afirmar amb total seguretat i objectivitat si la tècnica aporta beneficis envers la que utilitzen actualment els radiòlegs per establir un tractament o si, contràriament, acaba essent igual que el mètode vigent.

### 10.2.3. DRA. CRISTINA SAURA I DR. VICENTE PEG



La Dra. Cristina Saura és la directora de la Unitat de Mama de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron de Barcelona, i el Dr. Vicente Peg és el patòleg de mama del mateix hospital. Respecte a la utilització de l'OSNA, són partidaris d'utilitzar-la com a substituta de l'observació de l'estat del gangli amb microscopi. Discrepen amb els punts de vista exposats anteriorment argumentant que, com a mínim, ambdues tècniques són igual de vàlides a l'hora de poder determinar el tractament post-operatori de la pacient. D'aquesta manera, si se suposa que l'OSNA no aporta cap benefici, pel simple fet d'obtenir resultats quantitius i que no puguin dependre de possibles diferències observacionals, ja val la pena utilitzar-la. Tot i així, des del seu hospital opinen que l'OSNA sí que aporta millores. La nova tècnica dóna informació extra, ja que, a banda de detectar les metàstasis axil·lars i dir si el gangli és positiu o negatiu, també permet predir que hi hagi més ganglis afectats i evitar cirurgies. També han



demonstrat que es correlaciona amb el pronòstic, de manera que permet determinar diferents riscos pel que fa a la supervivència de les pacients. Aquest darrer argument s'acaba de presentar al Congrés Anual de l'American Society of Clinical Oncology (ASCO) i estan pendent de publicar-lo.

## 10.2.4. DR. OWEN UNG I DR. SUNIL LAKHANI



El Dr. Owen Ung és cap de la Unitat de Cirurgia de la Mama al Royal Brisbane and Women's Hospital i professor a la Universitat de Medicina de Queensland, a Austràlia. D'altra banda, el Dr. Sunil Lakhani és també professor de la Universitat de Medicina de Queensland. D'acord amb l'article publicat al diari australià ABC (66), els dos es mostren a favor d'utilitzar l'OSNA com a única tècnica, donant com a argument fonamental que redueix la necessitat de realitzar segones intervencions, ja que el fet de ser una anàlisi intraoperatori permet als professionals prendre una decisió d'acord amb els resultats de forma immediata. D'altra banda, també donen molta importància al fet que aquesta tècnica analitza el gangli sencer, sense deixar-ne al marge cap cèl·lula. Un estudi dut a terme a la Universitat de Queensland conclou que la precisió de la tècnica és d'entre un 95 i un 99%, de manera que els resultats es poden considerar molt fiables. De les 300 dones que són



tractades de càncer de mama cada any en aquest hospital, unes 50 s'estalvien passar per una segona intervenció quirúrgica per haver-se utilitzat l'OSNA, de manera que els dos doctors consideren que els beneficis són prou important per utilitzar-la de forma habitual.

Malgrat les discrepàncies, tots els doctors coincideixen en dir que al ser una tècnica tan nova, encara hi ha un llarg camí per recórrer i molts estudis a fer per a poder determinar acuradament els beneficis de l'OSNA, tant respecte a la qualitat de vida de les pacients com a l'hora de diagnosticar i establir un tractament adequat.

Mentrestant, però, que uns hospitals l'utilitzin i uns altres no, dependrà exclusivament de l'opinió al respecte que tinguin els professionals de cada centre, sense que uns ho facin de manera correcta ni els altres de manera incorrecta. Actualment, ambdues tècniques aporten uns beneficis similars, de manera que depenent del punt de vista des d'on es miri, es considerarà preferible l'ús d'una tècnica o d'una altra.

### 10.3. DISCUSSIÓ

Els arguments donats pels diferents professionals demostren discrepàncies envers l'ús de l'OSNA. Tots estan d'acord a l'hora de dir que l'OSNA és la millor tècnica per a detectar metàstasis, ja detecta les micrometàstasis molt millor que qualsevol altra. A partir d'aquí, comencen les disputes, centrades inicialment en el fet que en molts hospitals no s'aplica cap tractament sobre la pacient en el cas que tingui una micrometàstasi. Això fa que els hospitals es plantegin si és realment necessari utilitzar l'OSNA, ja que el seu principal avantatge no aporta cap diferència a l'hora de plantejar un tractament per a la pacient. Contràriament, però, hi ha hospitals que consideren fonamental saber l'estat del gangli i tenir constància de les micrometàstasis que puguin haver-hi, de manera que utilitzen l'OSNA per no obtenir falsos negatius en els casos de petites metàstasis.

D'altra banda, el fet d'evitar segones intervencions és l'altre dels arguments principals dels hospitals favorables a utilitzar l'OSNA, ja que no s'ha de fer passar a la pacient per una altra cirurgia, fet que millora la qualitat de vida d'aquestes. Per contra, els centres que han decidit no utilitzar-la diuen que el nombre de vegades que s'ha de sotmetre la pacient a una segona intervenció és bastant baix, de manera que els pocs casos que realment poden sortir-hi guanyant quan s'utilitza l'OSNA no justifiquen el cost que té el fet d'implantar la tècnica.

El factor costum intervé també en aquesta disputa, tot i que amb menor importància. Hi ha hospitals que creuen que si la tècnica vigent ja és prou bona, no cal canviar-la per una de nova a no ser que aquesta aportí avantatges significatius, de manera que prefereixen continuar amb el microscopi.

Malgrat tot, hi ha encara un llarg camí per recórrer. Hem vist quins són els avantatges de l'OSNA, però el que fa dubtar de la seva necessitat és el fet que actualment no se solen tractar els casos de micrometàstasi, i que el nombre de pacients que necessiten una segona intervenció és reduït. Tot i així, cada any hi ha centenars d'estudis per a buscar la cura o millorar el tractament del càncer de mama, de manera que si en un futur es descobreix un nou tractament que, per exemple, aturi les micrometàstasis i, fins i tot, les elimini, aleshores sí que seria fonamental poder-les detectar amb la màxima precisió, de manera que l'OSNA tindria una gran importància i milloraria considerablement el pronòstic. Està clar que els pròxims avenços en l'àrea ajudaran a determinar quina és la tècnica més efectiva.

A més a més, encara s'han d'estudiar les possibles aplicacions de l'OSNA en el tractament i diagnòstic d'altres tipus de càncers. El que en el càncer de mama pot no ser un benefici, en els altres potser ho és, i a la inversa, de manera que podria ser que en altres càncers l'OSNA aportí beneficis de gran significat que millorin clarament el pronòstic dels pacients.

## 11. CONCLUSIONS DEL TREBALL

Un cop finalitzada tant la part teòrica com la part pràctica en les que he dividit el treball, arriba el moment d'exposar les conclusions finals obtingudes.

Havent parlat amb els doctors dels quatre hospitals diferents, he arribat a les següents conclusions respecte a l'ús de l'OSNA:

- Cal fer més estudis i avenços per a determinar quina de les dues tècniques (OSNA o histologia) millora tant el diagnòstic com la qualitat de vida de les pacients.
- Els hospitals acaben decantant-se per una o altra opció en funció de subtils variables (estadístiques, econòmiques, d'hàbit...).
- Cal continuar investigant les possibles aplicacions de l'OSNA a l'hora de diagnosticar metàstasis d'altres tipus de càncers per saber si pot millorar el diagnòstic i qualitat de vida dels pacients.
- Ara com ara, és cert que les diferències entre l'OSNA i la histologia no són molt determinants, però tot i així, hi ha molts professionals que aposten per a utilitzar-la i seguir investigant, ja que la veuen com una tècnica amb grans expectatives i perspectives de futur.

L'OSNA és una tècnica que **ofereix unes millores difícils de valorar pel que fa al diagnòstic** i, en conseqüència, respecte a la qualitat de vida de les pacients de càncer de mama. En un primer moment, pot semblar que sí que aporta beneficis molt importants, però quan veiem els arguments que donen els hospitals que han decidit no utilitzar-la, veiem com aquests beneficis no són tan significatius, i **no està tan clar quina tècnica és millor, si l'OSNA o la histologia**.

Cap de les dues tècniques presenta una millora molt considerable en cap aspecte, sinó que ofereixen millores petites que fan que, depenent del punt de vista que prenguin els professionals d'un centre, aquests es decantin per utilitzar-ne una o una altra.

Evidentment, l'ús de l'OSNA en la detecció de metàstasi en el càncer de mama avançarà. **El món de la medicina està en canvi constant**. Cada any es descobreixen nous tractaments, i noves tècniques per a moltes malalties. Si això passa amb el càncer de mama i, per exemple, troben una manera de tractar les micrometàstasis, aleshores l'OSNA passarà a tenir un paper fonamental en la detecció de petites metàstasis, ja que en aquest aspecte és millor que la histologia. **Potser és qüestió de temps que l'OSNA amplii el seu camp d'aplicació i adquireixi més importància**. Actualment s'estan duent a terme molts estudis per determinar si es pot utilitzar també en altres tipus de càncer, fet que podria arribar a millorar molt el diagnòstic d'aquests.

Està clar que **cal continuar amb la recerca**.



## 12. ANNEX 1: TÈCNICA RT-LAMP

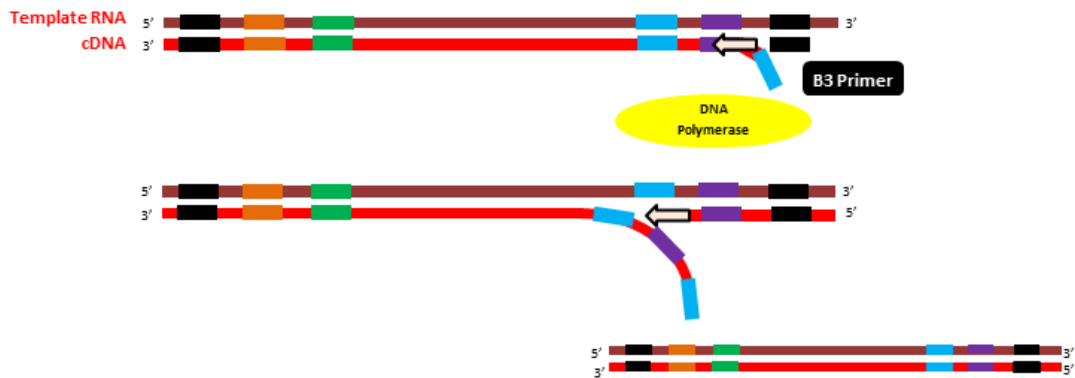
RT-LAMP és un mètode d'amplificació d'àcid nucleic en un sol pas. Mentre una PCR convencional és capaç de generar milions de còpies de DNA original i necessita diversos augments i disminucions de temperatura per a facilitar la replicació del DNA, aquesta nova tècnica prescindeix d'aquests diferents cicles i es manté a una temperatura constant d'entre 60 i 65 °C. Igual que la RT-PCR, la RT-LAMP utilitza transcriptases inverses per a sintetitzar DNA complementari (cDNA) a les cadenes d'RNA originals. Aquest cDNA s'amplifica tot seguit utilitzant DNA polimerases, generant  $10^9$  còpies per hora.

Quatre *primers* especialment dissenyats reconeixen diferents seqüències de cadena d'RNA original que tenen una alta especificitat, i s'hi adhereixen. Dos dels quatre *primers* involucrats són "*primers interiors*" (FIP i BIP), que s'encarreguen de sintetitzar noves cadenes d'DNA. Al seu torn, els "*primers exteriors*" (F3 i B3), separen les dues cadenes complementàries, i generen una altra cadena complementària a una de les dues que han separat prèviament. Aquests *primers* estan acompanyats sempre per una DNA polimerasa adherida en un principi al *primer*, que a banda d'afegir els nucleòtids necessaris per a la formació de les noves cadenes, també ajuda en el desplaçament de les cadenes i en separar les que són complementàries.

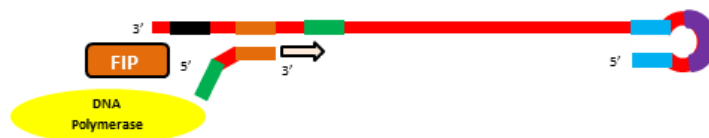
El *primer* BIP, acompanyat per la transcriptasa inversa (que sintetitza cadenes d'DNA a partir d'RNA), inicia el procés unint-se a una seqüència concreta a l'extrem 3' de la cadena original d'RNA i en sintetitza una de DNA complementària.



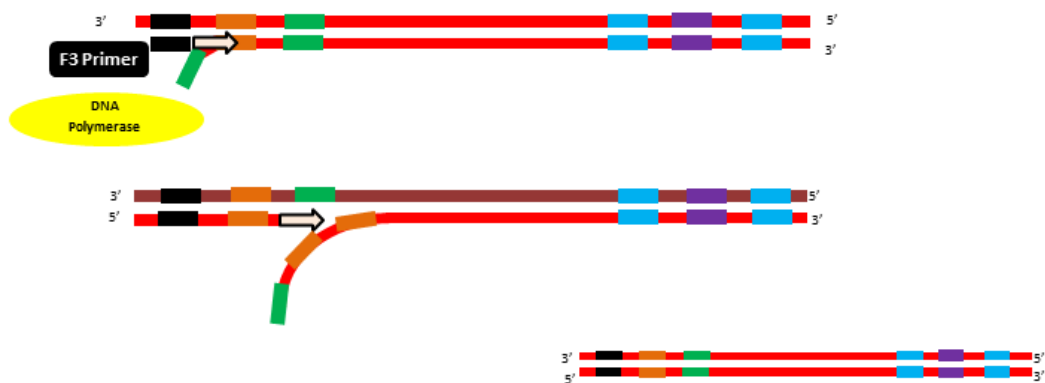
Tot seguit, el *primer* B3 s'uneix al mateix lloc on ho havia fet l'anterior *primer*, i amb l'ajuda d'una DNA polimerasa es forma una nova cadena de DNA complementària a l'original d'RNA, desplaçant simultàniament la còpia prèvia. La doble cadena resultant que conté l'RNA i una cadena de DNA, passa a ser innecessària i, per tant, ja no s'utilitza més.



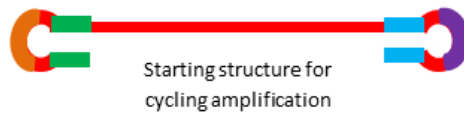
La cadena de DNA que queda, es doblega lligant-se sobre si mateixa formant un bucle a l'extrem 5'. Tot seguit, el *primer* FIP s'adhereix a l'extrem 3' d'aquesta mateixa cadena de DNA i, acompanyat per una DNA polimerasa, sintetitza una cadena complementària.



Un cop finalitzat el procés anterior, el *primer* F3, també acompanyat d'una DNA polimerasa, s'uneix al mateix lloc que el *primer* anterior, el FIP, i sintetitza una nova cadena de DNA complementària a la primera mentre desplaça la formada anteriorment. La doble cadena resultant passa a ser innecessària, com ha passat anteriorment, i ja no s'utilitza més.



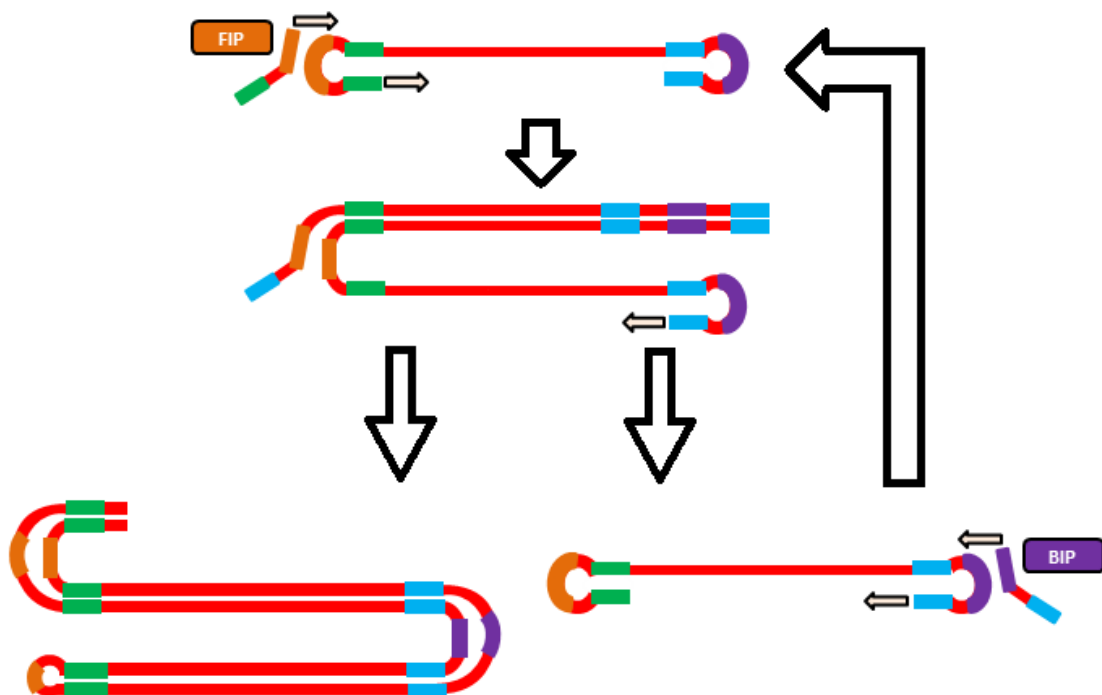
Aleshores, l'extrem 5' fa el mateix que havia fet l'altre extrem prèviament: es doblega sobre si mateixa formant un bucle. Aquesta cadena resultant, amb un bucle a punta i punta, serà la que actuarà com a punt d'inici dels cicles d'amplificació LAMP.



Un cop formada aquesta estructura, un *primer* FIP s'uneix a un dels bucles, mentre que un altre, també del mateix tipus, s'adhereix a l'extrem del mateix bucle. Cada una de les DNA polimerases que acompanyen el *primer* comença a sintetitzar una cadena complementària a la que hi ha, anant cadascuna en sentits contraris. La polimerasa adherida al bucle sintetitza el tros de cadena que arriba fins a l'altre bucle i queden unides com si fossin una cadena de DNA, mentre que la polimerasa de l'extrem, sintetitza també el mateix tros. Tot i així, com que la cadena del principi s'ha emparellat amb la cadena anterior, aquesta, malgrat també ser-ne complementària, queda lliure, fent que al final de si mateixa es formi un bucle, ja que queden dos trossos complementaris entre si.

Tot seguit, l'extrem del bucle que s'ha format a l'extrem de la cadena lliure, continua sintetitzant una cadena de DNA que la complementi. D'aquesta manera, arriba un moment que ha de desplaçar l'altra cadena complementària a la inicial, ja que passa entre mig de les dues per a unir-se amb la cadena original.

D'aquesta manera, la cadena que s'acaba alliberant adopta la mateixa forma que la que tenia la cadena inicial al començament: una sola cadena de DNA amb un bucle a cada un dels extrems, i que per tant, podrà repetir aquest procés, obtenint al final els mateixos resultats. Cada cop que es dugui a terme aquest procés, s'obtindrà una còpia més de la cadena.



## 13. BIBLIOGRAFIA

1. “Gangli limfàtic”. *Viquipèdia: l’enciclopèdia lliure* (Wiki a Internet). Wikimedia Foundation, Inc. (Consulta 19 març 2016). Disponible a: [https://ca.wikipedia.org/wiki/Gangli\\_limf%C3%A0tic](https://ca.wikipedia.org/wiki/Gangli_limf%C3%A0tic)
2. “Leucòcit”. *Viquipèdia: l’enciclopèdia lliure* (Wiki a Internet). Wikimedia Foundation, Inc. (Consulta 19 març 2016). Disponible a: <https://ca.wikipedia.org/wiki/Leuc%C3%B2cit>
3. “Sistema linfàtic”. *Wikipedia: la enciclopedia libre* (Wiki a Internet). Wikimedia Foundation, Inc. (Consulta 20 març 2016). Disponible a: [https://es.wikipedia.org/wiki/Sistema\\_linf%C3%A1tico](https://es.wikipedia.org/wiki/Sistema_linf%C3%A1tico)
4. *The lymph nodes* (en línia). Know your lymph nodes like your doctor does. (Consulta 8 maig 2016). Disponible a: <http://www.thelymphnodes.com/>
5. CLOSA, Daniel. “Càncer, pits, i ganglis sentinella”. *Diari Ara* (en línia), 2011. (Consulta 8 maig 2016). Disponible a: <http://ciencia.ara.cat/centpeus/2011/02/14/cancer-pits-i-ganglis-sentinelles/>
6. PÉREZ, Guillermo. *Estructura de los ganglios linfáticos* (en línia). (Consulta 16 agost 2016). Disponible a: [http://www.ganglioslinfaticos.com/estructura\\_de\\_los\\_ganglios\\_linfaticos](http://www.ganglioslinfaticos.com/estructura_de_los_ganglios_linfaticos)
7. Crash Course. *Lymphatic system* (Grabació en vídeo). Crash Course, 2015. Vídeo a Internet: 09:19 min. (Consulta 18 agost 2016). Disponible a: <https://www.youtube.com/watch?v=l7orwMgTQ5I>
8. *Cáncer de mama* (en línia). MedLine Plus, 2015. (Consulta 19 agost 2016). Disponible a: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/000913.htm>
9. “Mamella”. *Viquipèdia: l’enciclopèdia lliure* (Wiki a Internet). Wikimedia Foundation, Inc. (Consulta 22 agost 2016). Disponible a: <https://ca.wikipedia.org/wiki/Mamella>
10. “Càncer de mama”. *Viquipèdia: l’enciclopèdia lliure* (Wiki a Internet). Wikimedia Foundation, Inc. (Consulta 22 agost 2016). Disponible a: [https://ca.wikipedia.org/wiki/C%C3%A0ncer\\_de\\_mama](https://ca.wikipedia.org/wiki/C%C3%A0ncer_de_mama)
11. “Linfa”. *Wikipedia: la enciclopedia libre* (Wiki a Internet). Wikimedia Foundation, Inc. (Consulta 22 agost 2016). Disponible a: <https://es.wikipedia.org/wiki/Linfa>
12. GENÉ, M. Lluïsa. *El sistema immunitari* (en línia). 2013. (Consulta 22 agost 2016). Disponible a: <http://blocs.xtec.cat/marialluisa/files/2013/07/1.-El-sistema-immunitari.pdf>

13. *Cáncer de mama* (en línia). Dmedicina.com, 2015. (Consulta 22 agost 2016). Disponible a: <http://www.dmedicina.com/enfermedades/cancer/cancer-mama.html>
14. *Cáncer de mama, síntomas* (en línia). Asociación Española Contra el Cáncer, 2015. (Consulta 23 agost 2016). Disponible a: <https://www.aecc.es/SobreElCancer/CancerPorLocalizacion/CancerMama/Paginas/sintomas.aspx>
15. *Càncer de pit* (en línia). Bioinformàtica UAB. (Consulta 23 agost 2016). Disponible a: [http://bioinformatica.uab.es/biocomputacio/treballs00-01/portela/index\\_pit.html](http://bioinformatica.uab.es/biocomputacio/treballs00-01/portela/index_pit.html)
16. *CDI: carcinoma ductal invasivo* (en línia). Breastcancer.org, 2014. (Consulta 24 agost 2016). Disponible a: <http://www.breastcancer.org/es/sintomas/tipos/cdi>
17. *Diccionario de cáncer* (en línia). Instituto Nacional del Cáncer. (Consulta 24 agost 2016). Disponible a: <http://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario?cdrid=349392>
18. *Tipos de cáncer de seno* (en línia). American Cancer Society, 2016. (Consulta 24 agost 2016). Disponible a: <http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdeseno/guiadetallada/cancer-de-seno-what-is-breast-cancer-types>
19. COLLET DIVÍ, Imma; MACIÀ GUILÀ, Francesc. *Patología de la mama*. Hospital del Mar, Institut Municipal d'Assistència Sanitària de Barcelona, Unitat de Prevenció i Registre del Càncer, 2000. (Consulta 24 agost 2016)
20. *CDIS: carcinoma ductal in situ* (en línia). Breastcancer.org, 2014. (Consulta 25 agost 2016). Disponible a: <http://www.breastcancer.org/es/sintomas/tipos>
21. *CLI: carcinoma lobular invasivo* (en línia). Breastcancer.org, 2014. (Consulta 25 agost 2016). Disponible a: <http://www.breastcancer.org/es/sintomas/tipos>
22. *Carcinoma tubular de la mama* (en línia). Breastcancer.org, 2014. (Consulta 25 agost 2016). Disponible a: <http://www.breastcancer.org/es/sintomas/tipos>
23. *Carcinoma medular de la mama* (en línia). Breastcancer.org, 2014. (Consulta 25 agost 2016). Disponible a: <http://www.breastcancer.org/es/sintomas/tipos>
24. *Enfermedad de Paget en el pezón* (en línia). Breastcancer.org, 2014. (Consulta 25 agost 2016). Disponible a: <http://www.breastcancer.org/es/sintomas/tipos>
25. *Tratamiento del cáncer de seno (mama)* (en línia). Instituto Nacional del Cáncer, 2016. (Consulta 25 agost 2016). Disponible a: <http://www.cancer.gov/espanol/tipos/seno/pro/tratamiento-seno-pdq>

26. *Tipos de cáncer de mama* (en línia). Asociación Española Contra el Cáncer, 2013. (Consulta 25 agost 2016). Disponible a: <https://www.aecc.es/SobreEICancer/CancerPorLocalizacion/CancerMama/Paginas/tipos.aspx>
27. "Metastatic breast cancer". *Wikipedia, the free encyclopedia* (Wiki a Internet). Wikimedia Foundation, Inc. (Consulta 25 agost 2016). Disponible a: [https://en.wikipedia.org/wiki/Metastatic\\_breast\\_cancer](https://en.wikipedia.org/wiki/Metastatic_breast_cancer)
28. "Linfocito T regulador". *Wikipedia: la enciclopedia libre* (Wiki a Internet). Wikimedia Foundation, Inc. (Consulta 25 agost 2016). Disponible a: [https://es.wikipedia.org/wiki/Linfocito\\_T\\_regulador](https://es.wikipedia.org/wiki/Linfocito_T_regulador)
29. Halls, S. *Breast carcinoma metastasis statistics and effect on survival* (en línia). Moose and Doc, 2016. (Consulta 25 agost 2016). Disponible a: <http://breast-cancer.ca/metsurv-stat/>
30. *Metastatic cancer* (en línia). National Cancer Institute, 2016. (Consulta 25 agost 2016). Disponible a: <http://www.cancer.gov/types/metastatic-cancer>
31. Mastectomía (en línia). Medline Plus, 2016. (Consulta 26 agost 2016). Disponible a: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/002919.htm>
32. BORRÀS, Josep Maria. *Càncer de mama II* (en línia). Col·legi de farmacèutics de Barcelona, 2016. (Consulta 30 agost 2016). Disponible a: <http://www.farmaceuticonline.com/ca/dones/563-cander-de-mama-ii?start=1>
33. *La importància d'un enfoc multidisciplinar* (en línia). Institut Català d'Oncologia i Hospital Universitari de Bellvitge. (Consulta 30 agost 2016). Disponible a: <http://www.acmcb.es/files/425-9841-DOCUMENT/Hernandez4224Feb16.pdf>
34. MOLINA, Miguel. "Tamoxifè: risc de reducció de resposta terapèutica amb Fluoxetina i Paroxetina". *Bloc d'un metge de família* (bloc). 11 octubre, 2010. (Consulta 30 agost 2016). Disponible a: <http://metgedefamilia.blogspot.com.es/2010/10/tamoxife-risc-de-reduccio-de-resposta.html>
35. "Limfangitis". *Viquipèdia: l'enciclopèdia lliure* (Wiki a Internet). Wikimedia Foundation, Inc. (Consulta 30 agost 2016). Disponible a: <https://ca.wikipedia.org/wiki/Limfangitis>
36. *Biopsia de ganglio limfàtic centinela* (en línia). Instituto Nacional del Cáncer, 2011. (Consulta 31 agost 2016). Disponible a: <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/diagnostico-estadificacion/estadificacion/hoja-informativa-ganglio-centinela>

37. *Corte por congelación* (en línia). Todo en Salud, 2015. (Consulta 2 setembre 2016). Disponible a: <http://todo-en-salud.com/2010/05/corte-por-congelacion>
38. *Mètode OSNA en el gangli sentinella* (en línia). Barcelona, Centre Mèdic Teknon, 2015. (Consulta 2 setembre 2016). Disponible a: [http://www.teknon.es/ca\\_ES/instituto-oncologico/cancer-de-mama/metodo-osna-en-el-ganglio-centinela](http://www.teknon.es/ca_ES/instituto-oncologico/cancer-de-mama/metodo-osna-en-el-ganglio-centinela)
39. "Reverse transcription polymerase chain reaction". *Wikipedia, the free encyclopedia* (Wiki a Internet). Wikimedia Foundation, Inc. (Consulta 2 setembre 2016). Disponible a: [https://en.wikipedia.org/wiki/Reverse\\_transcription\\_polymerase\\_chain\\_reaction](https://en.wikipedia.org/wiki/Reverse_transcription_polymerase_chain_reaction)
40. *OSNA: la nueva generación de análisis de ganglios centinela en cáncer de mama*. Sant Just Desvern: Sysmex Corporation. (Consulta 2 setembre 2016).
41. VILARDELL, Felip. *Importancia de la evaluación de la expresión de CK19 en biopsias de cáncer de mama en pacientes sometidas a estudio del ganglio centinela mediante OSNA* (en línia). Lleida, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, 2013. (Consulta 2 setembre 2016). Disponible a: [https://www.seap.es/documents/228448/529737/04\\_Vilardell.pdf](https://www.seap.es/documents/228448/529737/04_Vilardell.pdf)
42. *Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Tutorial* (Grabació en vídeo). Anglaterra: New England Biolabs, 2015. Vídeo a Internet: 1:25 min. (Consulta 6 setembre 2016). Disponible a: <https://www.youtube.com/watch?v=L5zi2P4lqgw>
43. CORRALES, Guillermo. *PCR (Polymerase Chain Reaction)* (Grabació en vídeo). CanalDivulgación, Biocatalysis Group, Instituto de Química Orgánica General, Departamento de Química Bioorgánica, 2014. Vídeo a Internet: 1:25 min. (Consulta 6 setembre 2016). Disponible a: <https://www.youtube.com/watch?v=iQsu3Kz9NYo>
44. "Transcriptasa inversa". *Viquipèdia: l'enciclopèdia lliure* (Wiki a Internet). Wikimedia Foundation, Inc. (Consulta 6 setembre 2016). Disponible a: [https://ca.wikipedia.org/wiki/Transcriptasa\\_inversa](https://ca.wikipedia.org/wiki/Transcriptasa_inversa)
45. "Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification". *Wikipedia, the free encyclopedia* (Wiki a Internet). Wikimedia Foundation, Inc. (Consulta 6 setembre 2016). Disponible a: [https://en.wikipedia.org/wiki/Reverse\\_Transcription\\_Loop-mediated\\_Isothermal\\_Amplification](https://en.wikipedia.org/wiki/Reverse_Transcription_Loop-mediated_Isothermal_Amplification)
46. *OSNA (One Step Nucleic Acid Amplification) method* (en línia). Sysmex Corporation, 2015. (Consulta 8 setembre 2016). Disponible a: [http://sphere.sysmex.co.jp/en/r\\_and\\_d/lifescience02.html](http://sphere.sysmex.co.jp/en/r_and_d/lifescience02.html)

47. HYOSEOK, Yi. *LAMP* (Grabació en vídeo). 2013. Vídeo a Internet: 1:00 min. (Consulta 8 setembre 2016). Disponible a: <https://www.youtube.com/watch?v=ZXq756u1msE>
48. GUILLÉN PAREDES, M. Pilar et al. *Aplicación de la técnica OSNA en el análisis intraoperatorio del ganglio centinela en el cáncer de mama* (en línia). Servei de Cirurgia General i Digestiva i Servei d'Anatomia Patològica, Hospital General Universitari Morales Meseguer, Múrcia, Espanya, 2010. (Consulta 22 de setembre de 2016). Disponible a: <http://www.elsevier.es/es-revista-cirugia-espanola-36-articulo-aplicacion-tecnica-osna-el-analisis-S0009739X1000521X>
49. *Patologia mamària. Línies de recerca* (en línia). Servei de Ginecologia de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron, Àrea materno-infantil, Barcelona, 2016. (Consulta 25 setembre 2016). Disponible a: <http://www.ginecologiavhebron.com/unidad4.php?nom=lineas>
50. "Colorectal cancer". *Wikipedia, the free encyclopedia* (Wiki a Internet). Wikimedia Foundation, Inc. (Consulta 25 setembre 2016). Disponible a: [https://en.wikipedia.org/wiki/Colorectal\\_cancer#Genetics](https://en.wikipedia.org/wiki/Colorectal_cancer#Genetics)
51. *KRT19 keratin 19 [Homo sapiens (human)]* (en línia). National Center for Biotechnology Information, USA, 2016. (Consulta 25 setembre 2016). Disponible a: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3880>
52. *Cáncer gástrico* (en línia). Medline Plus, 2014. (Consulta 25 setembre 2016). Disponible a: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/000223.htm>
53. "Cáncer de estómago". *Wikipedia: la enciclopedia libre* (Wiki a Internet). Wikimedia Foundation, Inc. (Consulta 25 setembre 2016). Disponible a: [https://es.wikipedia.org/wiki/C%C3%A1ncer\\_de\\_est%C3%B3mago](https://es.wikipedia.org/wiki/C%C3%A1ncer_de_est%C3%B3mago)
54. REMOUNDOS, DD et al. *The use of one step nucleic-acid amplification (OSNA) in clinical practice: a single-centre study* (en línia). National Center for Biotechnology Information, USA, 2013. (Consulta 25 setembre 2016). Disponible a: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23375856>
55. *Intraoperative tests (RD- 100i OSNA system and Metasin test) for detecting sentinel lymph node metastases in breast cancer* (en línia). National Institute for Health and Care Excellence. (Consulta 25 setembre 2016). Disponible a: <https://www.nice.org.uk/guidance/dg8/chapter/4-The-diagnostic-tests>
56. *Acerca de Sysmex* (en línia). Sysmex Corporation, 2016. (Consulta 26 setembre 2016). Disponible a: <http://www.sysmex.es/empresa/que-hay-detras-de-sysmex/acerca-de-sysmex.html>



57. GONZÁLEZ MARTÍNEZ, Lucía. *Estudio de ganglio centinela en cáncer de mama ¿OSNA o hematoxilina-eosina?*. Hospital General de Burgos. (Consulta 27 setembre 2016). Disponible a: [http://www.evento.es/revistaACIRCAL/04/03.Original2\\_GC\\_OSNA\\_vs\\_HE\\_LEON.pdf](http://www.evento.es/revistaACIRCAL/04/03.Original2_GC_OSNA_vs_HE_LEON.pdf)
58. CSERNI, Gábor. "Intraoperative analysis of sentinel lymph nodes in breast cancer by one-step nucleic acid amplification". *Journal of Clinical Pathology* (en línia), 2011. (Consulta 27 setembre 2016). Disponible a: <http://jcp.bmj.com/content/65/3/193.full?sid=12c44d80-c054-4054-9c5d-5518668062f2>
59. CSERNI, Gábor. "How much is enough? Pathologic evaluation of sentinel lymph nodes". *Current breast cancer reports*. EEUU: Volum 4 (juny 2012), pàgina 89 - pàgina 95. (Consulta 27 setembre 2016).
60. TORRES, Erica; Navarro, G; BELLOSILLO, B. *Detecció de metàstasis en gangli limfàtic: tècnica OSNA*. Hospital del Mar, Institut Municipal d'Assistència Sanitària de Barcelona, Servei de Patologia. (Consulta 27 setembre 2016).
61. HERVEG, Jean-Pierre; BARCIA-MACAY, Maritza. *Las ADN polimerasas* (en línia). Universitat Catòlica de Louvain, Facultat de Medicina, Cochabamba, Bolívia, 2006. (Consulta 28 setembre 2016). Disponible a: <http://genemol.org/biomolespa/Enzimas/ADN-POL.html>
62. CORDOBA, Alicia. *Utilidad de la impronta en el estudio del ganglio centinela con el método OSNA* (en línia). Complejo Hospitalario de Navarra, 2011. (Consulta 28 setembre 2016). Disponible a: [http://www.seapcongresos.com/2011/SEC/20\\_mayo\\_vienes/0.3/08.00/Alicia\\_Cordoba.pdf](http://www.seapcongresos.com/2011/SEC/20_mayo_vienes/0.3/08.00/Alicia_Cordoba.pdf)
63. VAN'T VEER, Laura J.; DAI, Hongyue. *Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer* (en línia). *Nature*, 2002. (Consulta 28 novembre 2016). Disponible a: <http://www.nature.com/nature/journal/v415/n6871/full/415530a.html?cookies=accepted>
64. PEG, Vicente; ESPINOSA-BRAVO, Martin et al. *Intraoperative assessment of sentinel lymph node by one-step nucleic acid amplification in breast cancer patients after neoadjuvant treatment reduces the need for a second surgery for axillary lymph node dissection* (en línia). "The Breast, Volume 31", pàgines 40-45, es publicarà el 2017. (Consulta 30 novembre 2016). Disponible a: [http://www.thebreastonline.com/article/S0960-9776\(16\)30184-9/abstract](http://www.thebreastonline.com/article/S0960-9776(16)30184-9/abstract)

65. GODA, H et al. *One-step nucleic acid amplification for detecting lymph node metastasis of head and neck cancer* (en línia). American Society of Clinical Oncology, 2009. (Consulta 30 novembre 2016). Disponible a: <http://meetinglibrary.asco.org/content/33961-65>
66. MELLOR, Leonie. *New breast cancer detection machine shows extent of disease within 30 minutes* (en línia). ABC Austràlia, 2015. (Consulta 30 novembre 2016). Disponible a: <http://www.abc.net.au/news/2015-06-17/breast-cancer-detection-machine-shows-extent-of-disease-in-30min/6554450>
67. TAN, Wei et al. *Tumour-infiltrating regulatory T cells stimulate mammary cancer metastasis through RANKL–RANK signalling* (en línia). Nature, 2011. (Consulta 3 desembre 2016). Disponible a: <http://www.nature.com/nature/journal/v470/n7335/full/nature09707.html>