

Detecção de micrometástases na medula óssea de pacientes com câncer inicial: correlação com o estadiamento pós-cirúrgico (pTNM), idade e grau histológico

Tereza Sollero Claudio-da-Silva
Rosane Bizon
Maria Helena Nicola
Radovan Borojevic
Maurício Magalhães Costa

Detection of bone marrow micrometastases in patients with primary breast cancer: correlations with pTNM stage, age and histological grade

Resumo

A disseminação oculta de células tumorais é uma das maiores causas de recaída após o tratamento local, e a detecção de células epiteliais (micrometástases) na medula óssea de pacientes com câncer de mama pode ter implicações no prognóstico. O objetivo deste trabalho foi detectar micrometástases na medula óssea utilizando técnica de biologia molecular, a imunocitoquímica (ICC), e correlacioná-la com as características clínicas e patológicas apresentadas pelas pacientes selecionadas. O aspirado de medula óssea foi obtido de 37 pacientes portadoras de câncer de mama nos estádios clínicos I, II e IIIA, com indicação de tratamento cirúrgico. A punção da medula óssea foi realizada na crista ilíaca ântero-superior, imediatamente antes do procedimento cirúrgico, e estocada em tubos tratados com heparina. Para análise da imunocitoquímica, utilizamos anticorpo monoclonal pancitoqueratina. Nossos resultados mostraram especificidade e sensibilidade para a técnica de ICC. Os casos positivos para micrometástases incluem 26,3% dos pacientes sem e 72,2% dos pacientes com linfonodos positivos. Concluímos que a presença de micrometástases na medula óssea foi estatisticamente significativa quanto ao grau histológico do tumor e quanto ao número de linfonodos axilares comprometidos. Nas pacientes com axilas livres, consideradas de baixo risco, a presença de micrometástases na medula óssea permite identificar um subgrupo de pacientes de risco.

Abstract

As the early occult dissemination of tumor cells is one of the major causes of relapse after local treatment, the detection of epithelial cells (micrometastases) in the bone marrow of breast cancer patients may have prognostic implications. The aim of this study was to detect micrometastases in bone marrow, using a molecular biological method, immunocytochemistry, and correlate them with prognosis and other clinical and pathological features on the selected patients. Bone marrow aspiration was obtained from 37 patients at stages I, II or IIIA, already with indication of surgery treatment. Bone marrow punch was performed in anterior iliac crest, immediately before the breast cancer operation, and stored in heparin-treated tubes. For the immunocytochemical analysis we used monoclonal antibody pancytokeratin. Our results show sensitivity and specificity for immunocytochemical techniques. The presence of micrometastases positive cases included 23.6% of the patients without and 72.2% of those with lymph node metastases. We concluded that the presence of micrometastases in bone marrow had a statistically significant correlation with the histologic grade of the tumor and with the number of lymph node metastases. The presence of micrometastases in bone marrow identifies patients with node negative disease who are at a risk for recurrence.

Unitermos

Câncer de mama
Estágio pós-cirúrgico
Medula óssea
Micrometástases

Key words

Breast cancer
Post-surgical stage
Bone marrow
Micrometastases

Aceito para publicação em janeiro de 2003.

Hospitais Universitários Moncorvo Filho e Clementino Fraga Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), e Banco de Células do Programa Avançado de Biologia Celular Aplicado à Medicina do HUCFF/UFRJ.

Introdução

A disseminação oculta de células tumorais é uma das maiores causas de recaída após o tratamento local, e a detecção de células epiteliais (micrometástases) na medula óssea de pacientes com câncer de mama pode ter importantes implicações no prognóstico^(1, 2).

A identificação das micrometástases na medula óssea por técnicas histológicas convencionais é baixa. No entanto podem ser identificadas por métodos de maior sensibilidade, como a técnica de biologia molecular, a imunocitoquímica (ICC)⁽³⁾. As micrometástases representam o tumor metastático com dimensões de ± 2 mm de diâmetro. As células carcinomatosas que migram para a medula óssea tornam-se temporariamente quiescentes, o que vem a ser comprovado pela baixa taxa de proliferação⁽⁴⁾. Neste estágio as micrometástases normalmente não são atingidas nem afetadas pela quimioterapia⁽⁵⁾. Acredita-se que mais tarde elas possam tornar-se proliferativas, estimular a angiogênese e iniciar o processo de formação do tumor metastático. As micrometástases na medula óssea apresentam características de tecido epitelial e podem, assim, ser distinguidas de células hematopoiéticas de origem mesenquimal⁽⁶⁾. Na falta de marcador específico de células de carcinoma de mama têm sido utilizados marcadores de células epiteliais normais, como as citoqueratinas (CK), que são proteínas que formam o citoesqueleto de células epiteliais^(7, 8). Recentemente, estudos clínicos têm demonstrado que a presença de células epiteliais neoplásicas (micrometástases) na medula óssea está associada à diminuição da sobrevivência de pacientes com câncer de mama⁽⁸⁾. Enquanto o envolvimento de linfonodos axilares historicamente tem sido o maior indicador para o estadiamento do câncer de mama, recentes estudos têm mostrado que a presença de micrometástases na medula óssea, associada ou não com metástases nos linfonodos axilares, pode ser indicador para disseminação à distância.

Método

Foram estudadas 37 pacientes atendidas nos Hospitais Universitários Clementino Fraga Filho e Moncorvo Filho, ambos da Universidade Federal do Rio de Janeiro. As pacientes eram portadoras de carcinoma de mama palpável, estádios clínicos I, II e IIIA, sem nenhum tratamento prévio de quimioterapia e/ou radioterapia, e foram operadas no período compreendido entre janeiro de 1999 e agosto de 2000. Todas as pacientes apresentavam-se saudáveis, sem sinais clínicos de progressão da doença no tempo de inclusão do estudo. O protocolo de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho/Faculdade de Medicina/UFRJ. Após o consentimento informado, por escrito, foram selecionadas pacientes para estudo de micrometástases no aspirado de medula óssea. Todas as

37 pacientes foram submetidas a tratamento cirúrgico (mastectomia à Patey e/ou segmentectomia com linfadenectomia axilar), e a peça cirúrgica foi examinada para tumores e linfonodos. A punção da medula óssea foi realizada em centro cirúrgico, com as pacientes anestesiadas imediatamente antes. Após a assepsia e a anti-sepsia da região da crista ilíaca ântero-superior, foram aspirados 5ml de sangue da medula óssea em uma seringa de 10ml contendo heparina. Não foram registradas complicações na execução da técnica. A reação de imunocitoquímica consistiu na identificação específica de células epiteliais humanas, em amostras de sangue de medula óssea, onde foram retiradas 1×10^6 células leucocitárias e centrifugadas. Para eliminar a autofluorescência produzida por peroxidases endógenas das células da medula óssea, as lâminas foram incubadas com diamino benzidina 0,5mg/ml e peróxido de hidrogênio a 0,03%. O anticorpo primário utilizado foi o monoclonal antipancitokeratina (Sigma). Ele reconhece um epitopo comum às citoqueratinas 1, 4, 5, 6, 8, 10, 13, 18 e 19. Sendo de amplo espectro, reage especificamente com uma ampla variedade de células do tecido epitelial reativo e neoplásico. Não reage com tecido humano não-epitelial.

Para revelação da reação utilizou-se soro anti-IgG de camundongo marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC). Para a lâmina de controle negativo não foi utilizado o anticorpo primário. Como controle positivo foram utilizadas as linhagens estabelecidas de carcinoma de mama humano MCF-7 ou MDA-MB-435S. A observação da ICC foi realizada em microscópio de imunofluorescência (Zeiss modelo MC 100). Todas as lâminas foram analisadas por dois ou mais pesquisadores, sem que houvesse conhecimento prévio da resposta clínica e dos resultados histopatológicos das peças cirúrgicas de cada paciente.

Utilizamos o teste qui-quadrado para investigar a associação entre micrometástases e outros prognósticos variáveis.

Resultados

Na amostra estudada, a idade mediana foi de 51 anos (31 a 75 anos), sendo que 56% das pacientes estavam na pós-menopausa e 46%, na pré-menopausa. Cerca de 78,4% das pacientes foram submetidas a mastectomia com linfadenectomia axilar e 21,6%, a segmentectomia mais linfadenectomia axilar.

O tamanho da lesão variou de 0,5 a 6cm no seu maior diâmetro, e a média do tamanho dos tumores foi de $2,88 \pm 1,1$ cm.

Quanto ao estadiamento do tumor primário, foi observado que 27% apresentavam estágio T1; 67,6%, estágio T2; e 5,45%, estágio T3.

Na avaliação do envolvimento dos gânglios axilares, 49% exibiam metástases, enquanto 51% não apresentavam axila comprometida.

Em relação aos subtipos histológicos, observaram-se 32 (86,5%) casos de carcinoma ductal infiltrante, dois (5,4%) de lobular, dois (5,4%) de papilífero e um (2,7%) caso de medular.

Micrometástases foram identificadas em 18 pacientes: cinco (26,3%) das 19 pacientes com linfonodos ne-

gativos e 13 (72,2%) das 18 pacientes com linfonodos positivos.

Pela análise do grau histológico, obtido através dos critérios de Bloom e Richardson, 31% dos tumores eram bem diferenciados; 34,5% moderadamente diferenciados e 34,5% pouco diferenciados. Cinco pacientes não foram avaliadas (**Tabela**).

Discussão

Em nossos resultados, a técnica de imunocitoquímica apresentou sensibilidade adequada à identificação de uma célula epitelial tumoral em meio a um milhão de leucócitos totais de medula óssea, além de apresentar especificidade, pois não identificou resultado positivo quando avaliadas amostras de medula óssea de indivíduos saudáveis. O marcador utilizado para as células tumorais disseminadas foi o anticorpo monoclonal antipancitokeratina. Do total das 37 pacientes incluídas no estudo, 18 (48,6%) apresentaram micrometástases na medula óssea. Este dado, apesar de elevado, encontra-se dentro da faixa observada em outros estudos^(9, 10). No nosso estudo, a média de idade por faixa etária do acometimento de câncer de mama foi de 51 anos, compatível com os



Figura: Célula neoplásica presente na medula óssea de paciente com carcinoma de mama, positiva para citoqueratinas reveladas com isotiocianato de fluoresceína (FITC)

Tabela – Características clínicas e patológicas das pacientes com câncer de mama, e correlação da presença de células neoplásicas na medula óssea, pela reação de positividade com a citoqueratina

Fatores avaliados	Pacientes <i>n</i> = 37	CK positivo <i>n</i> = 18 (48,6)	CK negativo <i>n</i> = 19 (51,4)	<i>p</i>
Idade	51	51,4	55,6	0,3
Tamanho do tumor				0,48
T1	10	3	7	
T2	25	12 (48)	13 (52)	
T3	2	2		
Metástases linfonodos				0,005*
Nenhum (0/14)	19	5 (26,3)	14 (73,7)	
1 a 3 linfonodos (2/15)	9	5	4	
4 a 9 linfonodos (5/14)	4	3	1	
> 10 linfonodos (15/25)	5	5		
Tipo histológico				
Ductal infiltrante	32	16 (50)	16 (50)	
Outros	5			
Grau do tumor				0,013*
Grau I	10	1	9	
Grau II	11	6	5	
Grau III	11	8	3	
Não-avaliados	5			
Estado menopausal				0,63
Pré-menopausa	17	9 (53)	8 (47)	
Pós-menopausa	20	9 (45)	11 (55)	

dados relatados na literatura. A comparação entre o tamanho tumoral e o resultado da imunocitoquímica na medula óssea demonstrou que a média do tamanho dos tumores foi de 2,88cm, com uma variação de 0,5 a 6cm. Nas pacientes que apresentaram positividade para micrometástases na medula óssea, foi de 3,16cm, e nas pacientes que não apresentaram micrometástases na medula óssea, foi de 2,45cm. Esta diferença não foi significativa para os resultados da imunocitoquímica. No entanto é descrito na literatura que tumores maiores têm tendência a apresentarem um número maior de metástases nos linfonodos axilares. Das dez pacientes com T1, apenas três apresentaram positividade para citoqueratinas na medula óssea; das 25 com T2, 12 (48%) a apresentaram; e as duas pacientes com T3 apresentaram esta positividade. Esta diferença não é estatisticamente significativa, mas mostrou uma tendência de tumores maiores apresentarem micrometástases na medula óssea em comparação com o tamanho dos tumores menores. Esta divergência talvez decorra do pequeno número de nossa amostragem. Ao compararmos o número de linfonodos comprometidos e o resultados das micrometástases na medula óssea, nossos resultados demonstraram uma incidência significativamente maior (72,2%) de positividade para citoqueratinas na medula óssea nas pacientes que apresentaram número maior de comprometimento linfonodal do que nas pacientes com axila negativa (26,3%).

Após a consolidação da cirurgia conservadora da mama como método de escolha nos estádios iniciais, a grande controvérsia atualmente está voltada para o manejo da axila. A dissecação axilar possui um grau de morbidade significativo, sendo grande o interesse pela

busca de um método que evite o esvaziamento axilar nas pacientes com axila negativa⁽¹¹⁾. Apesar disso, ainda persiste como o principal fator prognóstico no câncer de mama, com importância fundamental para a escolha da terapia adjuvante. Contudo ocorre uma proporção alta de pacientes com linfonodos axilares negativos pertencentes a um grupo de baixo risco que irá recair da doença. No nosso estudo, das 37 pacientes incluídas, 19 apresentavam linfonodos negativos e, destas, cinco (26,3%) foram positivas para micrometástases de medula óssea, resultado que concorda com a literatura⁽¹²⁾.

A identificação de raras células epiteliais na medula óssea nas pacientes com câncer de mama pode representar risco para metástases. A presença de micrometástases aumenta o risco de recaída de pacientes nos estádios I, II ou III⁽⁸⁾.

Discussão

A citoqueratina pode ser utilizada como marcador para imunocitoquímica, pois apresentou sensibilidade e especificidade. A presença de micrometástases foi estatisticamente significativa quanto ao grau histológico do tumor e quanto ao número de linfonodos axilares comprometidos. Não houve correlação significativa entre os parâmetros prognósticos como idade, estado menopausal e tamanho tumoral. A despeito do pequeno número de pacientes avaliadas, a expectativa é de que a detecção de micrometástases na medula óssea venha a representar uma importante contribuição para a avaliação prognóstica dos tumores iniciais.

Referências bibliográficas

1. COTE RJ, ROSEN P, LESSER M *et al.* Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult bone marrow disseminated tumor cells. *J Clin Oncol* 1991; 9(10): 1749-56.
2. FROST P, LEWIN B. Clinical implications of metastatic process. *Lancet* 1992; 339: 1458-61.
3. SLOANE JP, ORMEROD MG, IMRIE SF, COOMBES RC. The use of antisera to epithelial membrane antigen in detection micrometastases in histological sections. *Br. J Cancer* 1980; 42: 392-8.
4. PANTEL K, COTE RJ, FODSTAD O. Detection and clinical importance of micrometastatic disease. *J Natl Cancer Inst* 1999; 7;91(13): 1113-24.
5. PUTZ E, WITTER K, OFFNER S *et al.* Phenotypic characteristics of cell lines derived from disseminated cancer cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumor: establishment of working models for human micrometastases. *Cancer Res* 1999; 59: 241-8.
6. BRAUN S, KENTENICH C, JANNI W *et al.* Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high-risk breast cancer patients. *J Clin Oncol* 2000; 18(1): 80-6.
7. PANTEL K, CHLIMOK G, ANGSTWURM M *et al.* Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow. *J Hematother* 1994; 3(3): 165-73.
8. BRAUN S, PANTEL K, JANNI W *et al.* Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II or III breast cancer. *N Engl J Med*. 2000; 342: 525-33.
9. REDDING WH, COMBES RC, MONGHAN P *et al.* Detection of micrometastases in patients with primary breast cancer. *Lancet* 1983; 2: 1271-4.
10. MOLINO AM, PELOSI G, TURAZZA M *et al.* Bone marrow micrometastases in 109 breast cancer patients: correlations with clinical and pathological features and prognosis. *Breast Cancer Research and Treatment* 1997; 42: 23-30.
11. GUENTHER JM, HANSEN NM, DiFRONZO LA *et al.* Axillary dissection is not required for all patients with breast cancer and positive sentinel nodes. *Arch Surg* 2003; 138(1): 52-6.
12. DIEL IJ, KAUFMANN M, COSTA SD, HOLLE R *et al.* Micrometastatic breast cancer in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1652-64.

Endereço para correspondência

Tereza Sollero Claudio-da-Silva
Avenida Pasteur 475/302 – Urca
CEP: 22290-240 – Rio de Janeiro-RJ
Telefax: 2541-1901
e-mail: tsollero@ism.com.br