UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE – UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

Renata Fragomeni Almeida

Metástase axilar em linfonodo sentinela nos carcinomas ductal e lobular infiltrantes de mama e correlação com axila positiva

Porto Alegre
2016

Renata Fragomeni Almeida

Metástase axilar em linfonodo sentinela nos carcinomas ductal e lobular infiltrantes de mama e correlação com axila positiva

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Dr. Cláudio Galleano Zettler
Co-orientador: Dra Cláudia Giuliano Bica

Porto Alegre
2016

Catalogação na Publicação

Almeida, Renata Fragomeni
Metástase axilar em linfonodo sentinela nos carcinomas ductal e lobular infiltrantes de mama e correlação com axila positiva / Renata Fragomeni Almeida. -- 2016.
53 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Patologia, 2016.

Orientador(a): Cláudio Galleano Zettler ; coorientador(a): Cláudia Giuliano Bica.

1. Axillary lymph node dissection. 2. Breast cancer. 3. Prognostic factors. 4. Sentinel lymph node biopsy. I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Agradecimentos

À minha mãe, Rosane, ao meu avô, Vicente, e à Reny, pelo amor, incentivo e apoio incondicionais, que sempre fizeram eu me sentir segura para continuar.

Ao meu pai, João Antônio, e à Evanisa, que leram cuidadosamente o meu trabalho, me ajudando e me encorajando com todo o carinho e a dedicação.

Ao professor Cláudio Galleano Zettler, por me ensinar não só patologia, mas também a desenvolver o pensamento crítico.

À professora Cláudia Giuliano Bica, pela oportunidade de aprendizado e de crescimento profissional e pessoal.

Sumário

Lista de Abreviaturas Utilizadas

INCA: Instituto Nacional do Câncer

LNS: Linfonodo não-sentinela

LS: Linfonodo sentinela

TN: Triplo negativo

WHO: Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*)

Resumo da Dissertação

Introdução:

O câncer de mama, se diagnosticado precocemente e tratado de forma adequada, possui bom prognóstico. Algumas características do tumor e do linfonodo sentinela estão comprovadamente relacionadas com o *status* axilar, alterando a sobrevida e a resposta ao tratamento.

Objetivos:

Este estudo pretende correlacionar a positividade do linfonodo sentinela com a presença de metástase em outros linfonodos axilares, além de correlacionar os fatores prognósticos do câncer de mama com a positividade dos linfonodos sentinela e axilares.

Material e Métodos:

Foram revisados todos os casos de mastectomia ou setorectomia com diagnóstico de carcinoma ductal ou lobular infiltrante de mama, com biópsia de linfonodo sentinela positiva e esvaziamento axilar entre janeiro de 2014 e julho de 2015. Os fatores clínicopatológicos e a classificação molecular foram avaliados como preditores de metástase em linfonodos axilares através das análises estatísticas univariada e multivariada.

Resultados:

Das 105 pacientes incluídas no nosso estudo, 58,1% apresentaram metástase axilar após o esvaziamento radical de linfonodos axilares. Encontramos também relação estatisticamente significativa entre metástase em linfonodos não-sentinela e multifocalidade do tumor e presença de invasão linfática nas análises univariada e multivariada. A análise univariada revelou que a presença de invasão extracapsular do linfonodo sentinela é um fator de risco estatisticamente significativo para metástase em linfonodos axilares.

Conclusões:

É importante que novos estudos sejam feitos a fim de que se possa estabelecer um grupo de risco para doença linfonodal metastática, possibilitando a indicação precisa do esvaziamento axilar radical, otimizando o tratamento das pacientes, e proporcionando melhor qualidade de vida.

Palavras-chave: Axillary lymph node dissection; Breast cancer; Prognostic factors; Sentinel lymph node biopsy

1. Introdução

Nas estatísticas mundiais, o câncer de mama é o segundo tipo mais comum e o mais frequente entre as mulheres. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2012), sua incidência aumentou dez vezes nas décadas de sessenta e setenta. Conforme estimativa do Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2016), são previstos 57.960 novos casos em 2016, sendo responsáveis por 14.388 mortes. Em 2012, a taxa de mortalidade por câncer de mama foi de 12,10 óbitos/100.000 mulheres (INCA, 2014).

A idade média do aparecimento da doença varia entre 50 e 60 anos, sendo a idade avançada o principal fator de risco para o seu desenvolvimento. Entre outros fatores, estão a história familiar e/ou pessoal de câncer de mama, a presença de mutações genéticas, principalmente nos genes BRCA1 e BRCA2, a exposição prolongada ao estrogênio, a exposição à radiação ionizante, a ingestão regular de bebidas alcoólicas, o sedentarismo e a obesidade (Buitrago *et al*., 2011; WHO, 2012)

O câncer de mama, se diagnosticado precocemente e tratado de forma adequada, possui bom prognóstico, com sobrevida média em cinco anos de 89,4%, podendo chegar a 98% nos casos de doença localizada. Por isso se faz necessário estudos que visem não só o diagnóstico em fases iniciais e o tratamento efetivo, mas também a qualidade de vida e a morbidade pós-tratamento (Buitrago *et al*., 2011).

Dentre os fatores prognósticos, o tamanho do tumor é um dos mais importantes. Sabe-se que tumores menores de 1,0 cm possuem apenas 10% a 20% de chance de apresentarem metástase linfonodal. Outros dois fatores relacionados à sobrevida são a graduação histológica (Classificação de

Nottingham) e o tipo histológico do tumor. Pacientes com carcinoma de tipo ductal infiltrante possuem geralmente maior envolvimento linfático em relação às pacientes com outros tipos de carcinomas infiltrantes de mama (Elston *et al*., 1991; Buitrago *et al*., 2011; WHO, 2012).

O estado linfonodal é o fator prognóstico mais importante, além de estar intimamente relacionado com a sobrevida no câncer de mama. Quando há envolvimento ganglionar, a taxa de recidiva é de 70%, enquanto nas pacientes com linfonodo negativo é de 20%. Além disso, o número de linfonodos acometidos e a presença de invasão extra-capsular também contribuem para o aumento do risco de recidiva da doença (Buitrago *et al*., 2011; Reeder-Hayes *et al*., 2011; Andree *et al*., 2012; Vohra *et al*., 2015; Yildiz *et al*., 2015).

Duas das principais questões discutidas atualmente são a sensibilidade do linfonodo sentinela em detectar metástase do câncer de mama e seu valor em indicar o esvaziamento axilar quando positivo. Apesar de o esvaziamento axilar proporcionar uma melhor avaliação prognóstica e um melhor controle regional, aumentando a sobrevida, alguns pacientes desenvolvem complicações em longo prazo decorrentes da cirurgia. Dessa forma, conhecer as características clínicas e histopatológicas que determinam a necessidade do esvaziamento axilar possibilita a indicação correta da cirurgia, diminuindo a iatrogenia e proporcionando melhor qualidade de vida e menor morbidade para as pacientes (Cheng *et al*., 2013; Gülben *et al*., 2014).

1.1. Classificação histológica dos carcinomas invasivos da mama

A Organização Mundial de Saúde (WHO, 2012) classifica os carcinomas invasivos mamários em de tipo não especial e de tipo especial. O carcinoma de tipo não especial compreende o anteriormente chamado de carcinoma ductal sem outra especificação, ou seja, sem as características citológicas ou arquiteturais que permitem classificá-lo em algum tipo especial. Este tipo é considerado o mais comum, representando 40 a 75% das neoplasias mamárias e seu prognóstico é variável, dependendo principalmente das características do tumor, como tamanho e grau histológico e da presença de metástase linfonodal (WHO, 2012; Sinn e Kreipe, 2013; Nenutil, 2015).

O de tipo especial envolve aqueles com características peculiares, como, por exemplo, secreção de muco; e ainda são divididos em especiais puros (padrão presente em mais de 90% da neoplasia) e mistos (quando há um componente não especial em 10 a 49% da neoplasia). Dentre os carcinomas de tipo especial, estão o lobular, o tubular, o cribriforme, o metaplásico, o mucinoso, o papilar e o micropapilar, bem como aqueles com padrão neuroendócrino e medular (WHO, 2012; Sinn e Kreipe, 2013; Nenutil, 2015).

O carcinoma lobular, que é o segundo tipo mais comum de neoplasia mamária, pode ser classificado em tipo clássico ou em variantes (sólida, alveolar, pleomórfica, tubulopapilar ou mista). As variantes apresentam prognóstico diferente daquele encontrado nos carcinomas lobulares do tipo clássico. Enquanto que 76% dos casos do tipo clássico correspondem ao grau histológico II de Nottingham, a maioria dos casos de variante sólida ou pleomórfica correspondem ao grau III (WHO, 2012; Sinn e Kreipe, 2013).

Os demais carcinomas de tipo especial: carcinomas tubular, cribriforme, mucinoso puro e com padrão medular e padrão neuroendocrino apresentam bom prognóstico, já que normalmente são de baixo grau histológico, enquanto que os metaplásicos podem ser de baixo ou alto grau, e geralmente possuem pior prognóstico, assim como o mucinoso misto. O carcinoma micropapilar está associado à maior invasão angiolinfática, o que determina um desfecho não favorável (WHO, 2012; Sinn e Kreipe, 2013; Nenutil, 2015).

Para a graduação histológica dos carcinomas invasivos, utiliza-se a Classificação de Nottingham, que leva em consideração a formação de túbulos, avaliando a diferenciação glandular, o pleomorfismo celular e o número de mitoses. Para avaliar essas três características utiliza-se um escore de um a três. Assim, se a neoplasia apresenta formação tubular em mais de 75% da superfície recebe um ponto, se em 10 a 75% recebe dois pontos, e se em menos de 10% recebe três pontos. Quanto ao pleomorfismo nuclear, se apresenta células regulares com núcleos pequenos recebe um ponto, se já há irregularidade moderada recebe dois pontos, e se há marcada variação recebe três pontos. O número de mitoses é contado em dez campos de grande aumento. Dessa forma, até quatro mitoses recebe um ponto, de cinco a nove recebe dois pontos e acima de dez, três pontos. Após, soma-se o grau final, classificando a neoplasia em grau I – bem diferenciada (3-5 pontos), grau II – moderadamente diferenciada (6-7 pontos) e grau III – pouco diferenciada (8-9 pontos) (Elston *et al*., 1991; WHO, 2012).

1.2. Biópsia do linfonodo sentinela

Até o início da década de 80, tanto as mastectomias, quanto as cirurgias conservadoras eram seguidas do esvaziamento axilar completo. No entanto, complicações como linfedema, diminuição do sensório, formação de seroma e dor ocorriam em 20 a 55% dos casos (Gourney *et al*., 2013).

A presença de metástase axilar reduz em 40% a sobrevida média em cinco anos, além de diminuir a resposta ao tratamento. Porém, ela é encontrada em menos da metade dos casos de câncer de mama. Nesse sentido, estudos visaram encontrar uma alternativa confiável para avaliar o status axilar, sem aumentar a morbidade pós-operatória (Cheng *et al*., 2013; Goodman *et al*., 2014; Gülben *et al*., 2014).

A biópsia do linfonodo sentinela está associada à menor morbidade no pós-operatório. A incidência de linfedema nos pacientes submetidos à linfadenectomia axilar completa é de 30%, enquanto que nos pacientes que realizaram apenas biópsia do linfonodo sentinela varia entre 3,5 e 11%. Essas complicações locais axilares contribuem fortemente para a morbidade e diminuição da qualidade de vida em longo prazo (Miller *et al*., 2012; Gourney *et al*., 2013; Manca *et al*., 2015).

Atualmente, a técnica do linfonodo sentinela está estabelecida como um método minimamente invasivo e com alta acurácia para avaliar a presença de metástase axilar em pacientes clinicamente negativos. Assim, o esvaziamento axilar está indicado quando o linfonodo sentinela for positivo, pelo risco de que outros linfonodos também possam ser metastáticos (Geertsema *et al*., 2010; Zhou *et al*., 2012; Van la Parra *et al*., 2015).

O linfonodo sentinela é definido como o primeiro linfonodo a receber a drenagem linfática vinda do tumor primário. No pré-operatório, injeta-se o contraste azul e o marcador radioativo na mama por abordagem peritumoral, periareolar ou intradérmica. A partir daí, identifica-se o linfonodo marcado com o radioisótopo, que pode ser supraclavicular, infraclavicular, paraesternal ou, mais comumente, axilar. Uma incisão é feita no local, retirando-se os linfonodos de interesse para análise (Goodman *et al*., 2014; Manca *et al*., 2015).

O exame transoperatório de congelação é o método mais utilizado para avaliar o linfonodo sentinela. Vohra *et al*. (2015) encontrou uma acurácia de

96%, com sensibilidade de 89%. Entretanto, o procedimento adotado por cada laboratório pode variar. Cserni *et al*. (2004) demostrou que 71% dos laboratórios utilizavam imunoistoquímica nos casos em que não era possível identificar metástase pela coloração com hematoxilina-eosina. Nestes casos, 20% dos exames negativos se tornaram positivos após a marcação com citoqueratinas.

Estudos foram realizados no sentido de definir a necessidade de exames complementares para o diagnóstico de metástases ocultas. Weaver *et al*. (2011) encontraram uma taxa de sobrevida média em cinco anos de 94,6% para aquelas pacientes em que a metástase oculta foi identificada após exame imunoistoquímico e de 95,8% para as pacientes sem metástase, não indicando benefício clínico das técnicas complementares.

Dessa forma, a recomendação atual é de que sejam feitos cortes seriados de todo o linfonodo em intervalos mínimos, a fim de identificar tanto as macrometástases (definida como maior de 2,0mm) quanto as micrometástases (menor ou igual a 2,0mm) e as células tumorais isoladas (menor ou igual a 0,2mm ou menos de 200 células) (Viale *et al*., 2001; Giuliano *et al*., 2011; Goodman *et al*., 2014).

1.3. Estudos que relacionaram a positividade do linfonodo sentinela com a presença de metástase axilar após esvaziamento completo

A partir da década de 90, estudos foram sendo realizados a fim de comprovar a sensibilidade do linfonodo sentinela em detectar metástase axilar e sua capacidade de predizer a necessidade do esvaziamento axilar radical, uma vez que este está associado à alta morbidade. Uma dessas pesquisas foi realizada por Turner *et al*. (1997) que selecionaram 103 pacientes de fevereiro de 1994 à outubro de 1995 com carcinoma mamário, os quais realizaram mastectomia seguida de biopsia do linfonodo sentinela e esvaziamento axilar. O linfonodo sentinela foi examinado pelo exame transoperatório de congelação e após processado e corado pela hematoxilina-eosina. Se negativo para metástase, era submetido à técnica de imunoistoquímica. Os demais linfonodos foram corados pela hematoxilina-eosina e também submetidos à imunoistoquímica. Do total de pacientes, 59% não apresentaram metástase linfonodal. Dentre os que apresentaram, em 25% o linfonodo sentinela foi positivo, não se identificando metástase nos demais linfonodos, e em apenas uma paciente com linfonodo sentinela negativo foi encontrada metástase em outro linfonodo axilar pela imunoistoquímica. Os resultados revelaram que se o linfonodo sentinela for negativo, a chance de metástase axilar é menor do que 0,1% (Miller *et al*., 2012; Gourney *et al*., 2013).

Na mesma perspectiva, Weaver *et al*. (2000) realizaram um estudo multicêntrico com 431 pacientes com carcinoma mamário submetidas à biópsia do linfonodo sentinela seguida do esvaziamento axilar total. Eles demonstraram sensibilidade do linfonodo sentinela em detectar metástase axilar de 88%, com especificidade de 100% e acurácia de 96,4%. Corroborando com os resultados do estudo de Turner *et al*. (1997), encontraram metástase axilar após o esvaziamento em 5% dos casos em que o linfonodo sentinela havia sido negativo. Analisaram também a relação das características tumorais com a presença de metástase, encontrando ampla relação do tamanho do tumor com o número de linfonodos axilares positivos.

Nos *et al*. (2003) também investigaram a temática em um estudo com 800 pacientes recrutadas de 1997 à 2002, e encontraram relação do tamanho da metástase no linfonodo sentinela com a possibilidade de metástases em outros linfonodos axilares. Em 6% dos casos em que as células tumorais foram identificadas apenas com o método complementar de imunoistoquímica, e em 7% dos casos de micrometástases identificadas pela coloração usual foram encontrados linfonodos positivos após o esvaziamento, comparado com os 39% dos casos com macrometástases. Entretanto, este estudo não conseguiu identificar um grupo em que a chance de metástases em linfonodos não-sentinelas fosse remota a ponto de não indicar o esvaziamento axilar complementar.

A partir daí, novas pesquisas surgiram, demonstrando que 40 a 70% dos pacientes com linfonodo sentinela positivo não apresentam metástase axilar em outros linfonodos, sendo que esta taxa sobe para 80% nos casos de micrometástase e 88% nos casos de células tumorais isoladas. Além disso, a taxa de recorrência axilar se mostrou baixa após o esvaziamento em pacientes com linfonodo sentinela positivo, variando de 0,2 a 0,9% nos casos de micrometástase e 1,0% nos casos de macrometástase. Pesquisas demonstraram que esta taxa se mantém baixa mesmo nos pacientes que não realizaram o esvaziamento. Reforçando esses resultados, Giuliano *et al.* (2010), no estudo ACOZOG Z0011, demonstraram que não havia diferença estatisticamente significativa na sobrevida e na taxa de recidiva entre os pacientes que realizaram esvaziamento radical e os que realizaram apenas biópsia do linfonodo sentinela (Giuliano *et al*., 2011; Francissen *et al*., 2012;

Verry *et al*., 2012; Tvedskov *et al*., 2012; Gülben *et al*., 2014; Van La Parra *et al*., 2015; Yildiz *et al*. 2015).

Estes resultados levaram a um questionamento sobre a necessidade do esvaziamento axilar completo em todos os casos. Dessa forma, grandes estudos vêm sendo realizados na tentativa de definir os fatores de risco que determinam a presença de metástase axilar, para que se possa determinar os grupos de pacientes que realmente se beneficiam de uma cirurgia radical. Com o objetivo de identificar esses fatores, Cserni *et al*. (2004) selecionaram 107 pacientes com carcinoma mamário. Em 40% dos casos foi encontrada metástase axilar em pelo menos um linfonodo não-sentinela. Este estudo encontrou um aumento de 62% no risco de metástase axilar para cada centímetro do tumor, de 13% para cada milímetro do tamanho da metástase no linfonodo sentinela e de 192% quando há invasão extracapsular do lindonodo. Assim, os resultados demonstram que a presença de macrometástase e de invasão extracapsular aumentam significativamente o risco de metástase para outros linfonodos, ao contrário de micrometástase ou células tumorais isoladas.

Mais recentemente, com a consolidação da classificação molecular dos carcinomas da mama, estudos incluíram não só as características histopatológicas dos tumores e do linfonodo sentinela, como também a classificação através do estudo imunoistoquímico. Nesta classificação os tumores são divididos em cinco grupos, de acordo com os marcadores que eles expressam. O chamado Luminal A apresenta receptores de estrogênio e progesterona, com índice proliferativo (Ki67) menor ou igual a 14%, o que o difere do Luminal B, em que o índice proliferativo é maior que 14%. O subtipo Luminal-HER2 é caracterizado por C-erbB-2 positivo e receptores hormonais positivos, enquanto o subtipo HER-2 apresenta C-erbB-2 positivo e receptores hormonais negativos. Já o Triplo Negativo apresenta todos os marcadores negativos, e é dividido em basal, quando CK5/6 positivo, e não-basal, quando este é negativo (Perou *et al*., 2000; Zhou *et al*., 2012; Gülben *et al*., 2014; Marrazzo *et al*., 2015).

Seguindo esta linha, Zhou *et al*. (2012), em uma pesquisa com 130 pacientes com linfonodo sentinela positivo, encontraram como tipo histológico o carcinoma ductal infiltrante em 95,4% dos casos. Além disso, metástase axilar foi encontrada em 58,4% dos casos. Neste estudo, os fatores mais importantes para a presença de metástase linfonodal foram o tamanho tumoral, o tamanho da metástase no linfonodo sentinela e o grau histológico do tumor. Quanto à classificação molecular, os subtipos Luminal A e Luminal B apresentaram maior risco.

Já Gülben *et al*. (2014) avaliaram 480 pacientes com carcinoma invasor de mama que realizaram biópsia do linfonodo sentinela e esvaziamento axilar radical de abril de 2009 à setembro de 2013. Os linfonodos foram processados e corados pela hematoxilina-eosina e avaliados por patologistas, que classificaram as metástases em micro (menor ou igual a 2,0mm) ou macrometástase (maior que 2,0mm). O tumor foi classificado de acordo com os resultados imunoistoquímicos em Luminal A (receptor de estrogênio e/ou recepetor de progesterona positivos e HER2 negativo), Luminal/HER2, Superexpressão do HER2 (receptores hormonais negativos e HER2 positivo) e Triplo Negativo (receptores hormonais negativos e HER2 negativo). Foram avaliados fatores como idade, estado menopausal, tamanho do tumor primário, grau histológico do tumor, invasão linfovascular, tamanho da metástase linfonodal, invasão extracapsular do linfonodo e subtipo do tumor como peditores de metástase axilar. Este estudo não encontrou associação da idade, do estado menopausal, do tamanho da metástase no linfonodo sentinela e da invasão extracapsular com a presença de metástase em outros linfonodos axilares. Entretanto, o tamanho do tumor primário, a presença de invasão angiolinfática, o grau histológico e o subtipo do tumor foram identificados como fatores de risco para metástase axilar. Dentre os subtipos, pacientes com Luminal HER2 e Superexpressão do HER2 apresentaram risco aumentado.

Marazzo *et al*. (2015) fizeram um estudo de coorte com 612 pacientes, avaliando idade, tamanho do tumor, grau histológico, invasão vascular e linfática e subtipo histológico (Luminal A, Luminal B HER2 positivo, Luminal B HER2 negativo, Superexpressão do HER2 e Triplo Negativo) como fatores de risco para metástase em linfonodos não-sentinela. Encontraram um efeito positivo da invasão vascular e angiolinfática e do tamanho do tumor, enquanto o subtipo Triplo Negativo se mostrou como efeito negativo na presença de metástase. Com isso concluíram que pacientes com subtipo Triplo Negativo e que não apresentam invasão angiolinfática não se beneficiam da linfadenectomia axilar radical.

Características do tumor, como grau histológico e tamanho no maior eixo, e características do linfonodo sentinela, como invasão extracapsular e tamanho da metástase, são alguns dos fatores já comprovadamente relacionados com o *status* axilar. O subtipo molecular também parece interferir, porém não existem evidências consistentes até o momento (Ganaraj *et al*., 2003; Reyal *et al*., 2012; Zhou *et al*., 2012; Gülben *et al*., 2014; Marrazzo *et al*., 2015).

Dessa forma, é importante que novos estudos sejam feitos a fim de que se possa estabelecer não só o risco de doença linfonodal metastática, mas também a indicação precisa do esvaziamento axilar radical, otimizando o tratamento das pacientes, e proporcionando melhor qualidade de vida.

1.4. Referências Bibliográficas

Andree C, Schmidt VJ, Munder BIJ, Seidenstücker K, Behrendt P, Witzel C *et al*. Detecting of breast cancer metastasis by means of regional lymph node sampling during autologous breast reconstruction – a screening of 519 consecutive patients. Med Sci Monit. 2012;18(10):CR605-610.

Buitrago F, Uemura G, Sena MCF. Fatores prognósticos em câncer de mama. Com. Ciências Saúde. 2011; 22 Sup 1:S69-S82.

Cheng YS, Kuo SJ, Chen DR. Sparing sentinel node biopsy through axillary lymph node fine needle aspiration in primary breast cancers. World Journal of Surgical Oncology. 2013, 11:296.

Cserni G, Amendoeira I, Apostolikas N. Discrepancies in current practice of pathological evaluation of sentinel lymph nodes in breast câncer: results of a questionnaire based survey by the European Working Group for Breast Screening Pathology. J Clin Pathol. 2004; 57(7):695-701.

Cserni G, Burzykowski T, Vinh-Hung V, Kocsis L, Boross G, Sinko M *et al*. Axillary Sentinel Node and Tumour-related Factors Associated with Non-sentinel Node Involvement in Breast Cancer. Jpn J Clin Oncol 2004; 34(9)519–524.

Elston CW, Ellis IO: Pathological prognostic factors in breast câncer I. The value of histological grade in breast câncer: experience from a large study with long-term follow-up. Histopathology,1991, 19:403-410.

Francissen CMTP, Dings PJM, van Dalen T, Strobbe LJA, van Laarhoven HWM, Wilt JHW. Axillary Recurrence After a Tumor-Positive Sentinel Lymph Node Biopsy Without Axillary Treatment: A Review of the Literature. Ann Surg Oncol. 2012; 19:4140–41.

Ganaraj A, Kuhn JA, Jones RC, Grant MD, Andrews V, Knox S, *et al*. Predictors for nonsentinel node involvement in breast cancer patients with micrometastases in the sentinel lymph node. BUMC proceedings. 2003; 16:3–6.

Geertsema D, Gobardhan PD, Madsen EVE, Albregts M, van Gorp J, Hooge P *et al*. Discordance of Intraoperative Frozen Section Analysis with Definitive Histology of Sentinel Lymph Nodes in Breast Cancer Surgery: Complementary Axillary Lymph Node Dissection is Irrelevant for Subsequent Systemic Therapy. Ann Surg Oncol. 2010; 17:2690–2695.

Giuliano AE, McCall L, Beitsch P, Whitworth PW, Blumencranz P, Leitch AM *et al*. Locoregional recurrence after sentinel lymph node dissection with or without axillary dissection in patients with sentinel lymph node metastases: the American College of Surgeons Oncology Group Z0011 randomized trial. Ann Surg 2010;252:426–32; discussion 32-3.

Giuliano AE, Hunt KK, Ballman KV, Beitsch PD, Whitworth PW, Blumencranz PW *et al*. Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis: a randomized clinical trial. JAMA 2011;305:569–75.

Goodman S, O´Connor A, Kandil D, Khan A. The Ever-Changing Role of Sentinel Lymph Node Biopsy in the Management of Breast Cancer. Arch Pathol Lab Med. 2014;138:57-64.

Gournay ED, Guyomard A, Coutant C, Boulet S, Arveux P, Causeret S *et al*. Impact of sentinel node biopsy on long-term quality of life in breast cancer patients. British Journal of Cancer. 2013;109,2783-2791.

Gülben K, Berberoğlu U, Aydoğan O, Kınaş V. Subtype Is a Predictive Factor of Nonsentinel Lymph Node Involvement in Sentinel Node-Positive Breast Cancer Patients. J Breast Cancer. 2014;17(4):370-37.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Estimativa 2014: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro:INCA,2014.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Estimativa 2016: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro:INCA,2016.

Manca G, Rubello D, Tardelli E, Giammarile F, Mazzarri S, Boni G. Sentinel Lymph Node Biopsy in Breast Cancer: Indications, Contraindications, and Controversies. Clin Nucl Med. 2015; 41(2):126-33.

Marrazzo A, Boscaino G, Marrazzo E, Taormina P, Toesca A. Breast cancer subtypes can be determinant in the decision making process to avoid surgical axillary staging: A retrospective cohort study. Int J Surg, 2015;S1743-9191(15)01074-2.

Miller CL, Specht MC, Scolny MN, Jammallo LS, Horick N, O`Toole J, *et al*. Sentinel lymph node biopsy at the time of mastectomy does not increase the risk of lymphedema: implications for prophylactic surgery. Breast Cancer Res Treat. 2012; 135(3):781–789.

Nenutil R. A revolution postponed indefinitely.WHO classification of tumors of the breast 2012: the main changes compared to the 3rd edition (2003). Cesk Patol. 2015;51(1):23-5.

Nos C, Harding-MacKean C, Fréneaux P, Trie A, Falcou MC, Sastre-Garau X *et al*. Prediction of tumour involvement in remaining axillary lymph nodes when the sentinel node in a woman with breast cancer contains metastases. Br J Surg. 2003.90: 1354–1360.

Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, *et al*. Molecular portraits of human breast tumours. Nature. 2000.406: 747–752.

Reeder-Hayes KE, Bainbridge J, Meyer AM, Amos KD, Weiner BJ, Godley PA, *et al*. Race and age disparities in receipt of sentinel lymph node biopsy for early-stage breast cancer. Breast Cancer Res Treat. 2011;128(3):863–871.

Reyal F, Belichard C, Rouzier R, de Gournay E, Senechal C, Bidard FC, *et al*. Non-sentinel lymph node metastasis prediction in breast cancer with metastatic sentinel lymph node: impact of molecular subtypes classification. PLoS One 2012; 7:e47390.

Sinn HP, Kreipe H. A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition. Breast Care (Basel). 2013; 8(2):149–154.

Turner R, Ollila W, Krasne D, Giuliano A. Histopathologic Validation of the Sentinel Lymph Node Hypothesis for Breast Carcinoma. Ann. Surg. 1997. Vol. 226, No. 3, 271-278.

Tvedskov TF, Jensen M, Lisse IM, Ejlertsen B, Balsley B, Kroman N. High risk of non-sentinel node metastases in a group of breast cancer patients with micrometastases in the sentinel node. Int. J. Cancer. 2012:131,2367–2375.

Van La Parra RFD, de Wilt JHW, Mol SJJ, Mulder H, Roos WQ, K Bosscha. Is SLN Biopsy Alone Safe in SLN Positive Breast Cancer Patients? The Breast Journal, Volume 21 Number 6, 2015: 621–626.

Verry H, Lord SJ, Martin A, Gill G, Lee CK, Howard K *et al*. Effectiveness and cost-effectiveness of sentinel lymph node biopsy compared with axillary node dissection in patients with early-stage breast cancer: a decision model analysis. British Journal of Cancer.2012; 106:1045 – 1052.

Viale G, Maiorano E, Mazzarol G. Histologic detection and clinical implications of micrometastases in axillary sentinel lymph nodes for patientes with brast carcinoma. Cancer. 2001; 92(6):1378-1384.

Vohra LM, Gulzar R, Saleem O. Intra operative frozen examination of sentinel lymph node in breast câncer. J Ayub Med Coll Abbottabad. 2015 Jan-Mar;27(1):40-4.

Weaver DL, Krag DN, Ashikaga T, Harlow SP. O´Connell M. Pathologic analysis of sentinel and nonsentinel lymph nodes in breast carcinoma. Cancer, 2000. 88:1099–1107.

Weaver DL, Ashikaga T, Krag DN, Skelly JM , Anderson SJ, Harlow SP *et al*. Effect of Occult Metastases on Survival in Node-Negative Breast Cancer. N Engl J Med.2011;364(5):412–421.

World Health Organization. Lakhani S, Ellis I, Schnitt S, Tan PH van de Vijver MJ. 4th. Lyon: IARC Press; 2012. WHO Classification of Tumours of the Breast.

Yildiz R, Urkan M, Hancerliogulları O, Kılbaş Z, Ozturk E, Mentes MO, *et al*. Comparison of five different popular scoring systems to predict nonsentinel lymph node status in patients with metastatic sentinel lymph nodes: a tertiary care center experience. SpringerPlus (2015) 4:651. DOI 10.1186/s40064-015-1442-4.

Zhou W, He Z, Xue J, Wang M, Zha X, Ling L *et al*. Molecular Subtype Classification Is a Determinant of Non-Sentinel Lymph Node Metastasis in Breast Cancer Patients with Positive Sentinel Lymph Nodes. PLoS ONE. 2012;7(4): e35881.

2. Objetivos

2.1. Objetivo principal

Descrever e correlacionar os dados clínicos, histopatológicos e moleculares dos carcinomas ductal e lobular infiltrantes da mama de espécimes cirúrgicos de mastectomia e setorectomia associados à biópsia de linfonodo sentinela e ao esvaziamento axilar

2.2. Objetivos secundários

Relacionar a positividade do linfonodo sentinela com a presença de metástase em outros linfonodos axilares

Relacionar os fatores prognósticos do câncer de mama com a positividade dos linfonodos sentinela e axilares

3. Artigo científico redigido em inglês

Axillary metastasis in sentinel lymph node on ductal and lobular breast infiltrating carcinomas and correlation with positive axilla

Keywords: Axillary lymph node dissection, Breast cancer, Prognostic factors, Sentinel lymph node biopsy

Abstract

Some characteristics of the tumor and of the sentinel lymph node are proven to be related with the axillary status in breast cancer. This study aims to correlate the positivity of the sentinel lymph node with the presence of metastasis in other axillary lymph nodes, besides correlating the prognostic factors of breast cancer with the positivity of sentinel and axillary lymph nodes. All cases of mastectomy and breast conserving surgery with diagnosis of ductal or lobular infiltrating breast carcinoma, with positive sentinel lymph node biopsy and axillary dissection between January, 2014 and July, 2015 were reviewed. The clinicopathological factors and molecular classification were evaluated as metastasis predictors in axillary lymph nodes after radical dissection. Sixty of 105 patients exhibited non-sentinel lymph node metastasis. Statistically significant relationship was also found between metastasis in non-sentinel lymph nodes and tumor multifocality and presence of lymphatic invasion in univariate and multivariate analysis. The univariate analysis revelead that presence of extracapsular invasion of the sentinel lymph node was a significant risk factor of axillary lymph nodes metastasis. It is important that new studies are performed so that it is possible to establish a risk group for lymph node

metastasis, allowing the precise indication of radical axillary dissection, in order to optimize the treatment of patients and to proportionate a better quality of life.

Introduction

Breast cancer, if diagnosed early and properly treated, has good prognosis, with mean survival in five years of 89.4%, reaching 98% in cases of localized disease. Among the prognostic factors, the tumor size is one of the most important ones. It is known that tumors smaller than 1.0 cm have only between 10% and 20% of chances of having lymph node metastasis. Two other factors related to survival are the histological grade (Nottingham classification) and the histological type of the tumor [1].

Lymphonodal status is the most important prognostic factor, besides being closely related with survival in breast cancer. When there is nodal involvement, the recurrence rate is 70%, while in patients with negative lymph node it is 20%. Besides, the number of affected lymph nodes and the presence of extra-capsular invasion also contribute for the increase of illness recurrence [1-5].

Until the beginning of the 80’s, both mastectomies as well as conservative surgeries were followed by complete axillary dissection. However, complications such as lymphedema, decreased sensorimotor, seroma formation and pain happened in 20% and 55% of the cases [6].

Biopsy of the sentinel lymph node is associated with smaller morbidity in post-operatory. The incidence of lymphedema in patients submitted to complete axillary lymphadenectomy is 30%, while in patients that performed only biopsy of the sentinel lymph node it ranges between 3.5% and 11%. Thus, the sentinel lymph node technique was accepted as a minimally invasive method and having good accuracy to evaluate the presence of axillary metastasis in clinically negative patients. Therefore, axillary dissection is indicated when the sentinel lymph node is positive, due to the risk that other lymph nodes may also be metastatic [6-9].

Studies demonstrate that between 40% and 70% of patients with positive lymph node have no axillary metastasis in other lymph nodes. This rate increases to 80% in cases of micrometastasis and to 88% in cases of isolated tumoral cells. Those results lead to a questioning about the need of complete axillary dissection in all cases [8, 10-16].

Besides that, the rate of axillary recurrence is small after dissection in patients with positive sentinel lymph node, ranging from 0.2% until 0.9% in cases of micrometastasis and until 1.0% in cases of macrometastasis. Recently, new researchers demonstrated that this rate remains low even in patients that did not perform the dissection, not changing the survival in this group. Reinforcing those results, the ACOZOG Z0011 (2011) [18] study demonstrated that there was no statistically significant difference in the survival and recurrence rate among patients who performed radical dissection and the ones that only performed biopsies of the sentinel lymph node [5, 14-20].

Thus, large studies have been executed trying to define the risk factors which determinate the presence of axillary metastasis. Tumor characteristics, such as histological grade and size along the greater axis and characteristics of the sentinel lymph node, such as extracapsular invasion and size of the metastasis, are some of the factors already proved to be related with the axillary status. Molecular subtype also seems to interfere, but there are no consistent evidences until this moment [8, 19, 21-23].

This study aims to correlate the positivity of the sentinel lymph node with the presence of metastasis in axillary lymph nodes, besides correlating the prognostic factors of breast cancer with the positivity of sentinel and axillary lymph nodes.

Methods

This is a retrospective study, in which all cases of mastectomy or breast conserving surgery with pathological diagnosis of ductal or lobular infiltrating breast carcinoma, with positive sentinel lymph node biopsy and axillary dissection, from the Laboratory of Pathology and Cytology of Hospital Santa Rita, in the Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre Hospital Complex, between January, 2014 and July, 2015 were reviewed. The Committee of Ethics in Research from the "Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre" approved the study with number 525.170, according to Resolution 466/2012 from the CNS/MS.

Medical records and pathological reports were analyzed, as well as slides stained with hematoxylin and eosin and slides from the immunohistochemical tests of surgical specimens stored in paraffin block. Besides, all pathological and immunohistochemical tests were analyzed by the same group of pathologists, using staining with hematoxylin and eosin for evaluating the primary tumor and the presence of axillary metastasis. The immunohistochemical was performed in all cases, selecting the cut with more representativeness of the primary tumor. This included Estrogen Receptor (clone SP1), Progesterone Receptor (clone 1E2), CK 5/6 (clone D5/16B4 – Ventana), E-cadherin (clone 36 - Ventana), Ki67 (clone 30-9 – Ventana), P53 (clone DO-7) and CerbB2 (clone 4B5).

According to the expression of those markers, neoplasms were classified into five categories: Luminal A (positive hormonal receptors, negative HER2, Ki67 lower than 14%), Luminal B (positive hormonal receptors, negative HER2, Ki67 greater than 14%), Luminal-HER2 and HER2 (positives hormonal receptors and HER2 or negatives hormonal receptors and positive HER2), Triple Negative Basal (negatives hormonal receptors and HER2 and positive CK5/6) and Triple Negative Non-Basal (negatives hormonal receptors, HER2 and CK5/6).

Factors including age, tumor size along the greater axis, multifocality, multicentricity, histological diagnosis, degree of differentiation, Nottingham histological grade, vascular invasion, lymphatic invasion, perineural invasion, skin and nipple impairment, necrosis in the infiltrating component, presence of microcalcification, lymphoplasmacytic response, presence of *in situ* associated component, extracapsular invasion of the sentinel lymph node and molecular classification of the neoplasm were evaluated as metastasis predictors in axillary lymph nodes by chi-squared and Fisher's exact test. Statistically significant risk factors for non-sentinel lymph node metastasis in the univariate analysis were included in a multivariate analysis using the logistic regression model. A value of $p < 0.05$ was considered as statistically significant. All data analyses were carried out using the SPSS version 18.0 for Windows.

Results

One-hundred and five (105) patients with diagnosis of ductal or of lobular infiltrating breast carcinoma were identified, having metastasis in the sentinel lymph node and that performed mastectomy and breast conserving surgery, followed by radical axillary lymphadenectomy. The average age of those patients was 56 years old (ranging from 27 until 90 years old) and 96.2% had diagnosis of infiltrating ductal carcinoma. Most of the tumors (59.0%) measured between 2.0 and 5.0 cm along the greater axis, 13.3% of them were multifocal and 2.9% were multicentric. Regarding the degree of differentiation, 72.4% were poorly differentiated and 56.2% corresponded to Nottingham's grade III. Lymphatic, vascular and perineural invasion was identified in 63.8%, 4.8% and 7.6% of the cases, respectively. In 34.3% of the infiltrating carcinomas there was component of *in situ* carcinoma associated. Skin and nipple impairment, necrosis in the infiltrating component, microcalcification and lymphoplasmacytic response were present in 7.6%, 8.6%, 18.1% and 61.9% of the cases, respectively. Luminal A molecular classification was found in 46.7% of cases, followed by Luminal B, which corresponded to 37.1% of cases.

In 22.9% of sentinel lymph node biopsies the presence of extracapsular invasion has been identified. Regarding axillary dissection, 58.1% of the patients had metastasis at least in one lymph node. When grouped according to the *pTNM Pathological Classification*, 21.0% had metastasis in 1, 2 or 3 lymph nodes (pN1), 26.7% had between 4 and 9 lymph nodes (pN2) and 10.5% had between 10 or more lymph nodes (pN3). The pathological characteristics of the sample are resumed in Table 1.

In univariate analysis the presence of lymphatic invasion was more commonly observed in the group with metastasis in axillary lymph nodes (75.4% vs. 47.7%, p=0.003). Tumor multifocality was also a statistically significant risk factor (19.7% vs. 4.5%, p=0.021), as well as the presence of extracapsular invasion of the sentinel lymph node (29.5% vs. 13.6%, p=0.045).

Factors age, tumor size along the greater axis, multicentricity, histological diagnosis, degree of differentiation, Nottingham histological grade, vascular invasion, perineural invasion, skin and nipple impairment, necrosis in the infiltrating component, presence of microcalcification, lymphoplasmacytic response, presence of associated component *in situ* and molecular classification of the neoplasm have not shown to be statistically significant risk factors. Results of the univariate analysis are represented in Table 2.

In the multivariate analysis (Table 3), lymphatic invasion (p=0.004) and multifocality (p=0.039) were significant predictors of non-sentinel lymph node metastasis. Otherwise, extracapsular invasion of the sentinel lymph node has not shown to be a significant factor of metastasis in axillary lymph nodes.

Table 1. Pathological characteristics of patients with breast invasive carcinoma and metastasis in sentinel lymph node

Characteristics	**Number(%)**
Multicentricity	
Present	3 (2.9)
Absent	102 (97.1)
Multifocality	
Present	14 (13.3)
Absent	91 (86.7)
Tumor size	
<2.0cm	40 (38.1)
2.0-5.0cm	62 (59.0)
>5.0cm	3 (2.9)

Histological diagnosis	
Ductal	101 (96.2)
Lobular	4 (3.8)
Notthingham's classification	
Degree I	5 (4.8)
Degree II	41 (39.0)
Degree III	59 (56.2)
Lymphatic invasion	
Present	67 (63.8)
Absent	38 (36.2)
Perineural invasion	
Present	8 (7.6)
Absent	97 (92.4)
Vascular invasion	
Present	5 (4.8)
Absent	100 (95.2)
In situ carcinoma	
Present	36 (34.3)
Absent	69 (65.7)
Skin and nipple impairment	
Present	8 (7.6)
Absent	97 (92.4)
Molecular classification	
Luminal A	49 (46.7)
Luminal B	39 (37.1)

Luminal-HER2 and HER2	9 (8.6)
TN Basal	6 (5.7)
TN Non-basal	2 (1.9)
Extracapsular invasion of SL	
Present	24 (22.9)
Absent	81 (77.1)
Metastasis in NSL	
Absent	44 (41.9)
1-3 linf.	22 (21.0)
4-9 linf.	28 (26.7)
10 or more linf.	11 (10.5)

TN = Triple Negative; SL= Sentinel Lymph Node; NSL = Non-sentinel Lymph Node

Table 2. Univariate analysis of risk factors for axillary metastasis

Variable	**Negative NSL**	**Positive NSL**	***p*-value**
Multicentricity			0.622
Present	1	2	
Absent	43	59	
Multifocality			0.021
Present	2	12	
Absent	42	49	
Tumor size			0.237
<2.0cm	20	20	
2.0-5.0cm	22	40	

>5.0cm	2	1	
Notthingham's classification			0.168
Degree I	4	1	
Degree II	18	23	
Degree III	22	37	
Lymphatic invasion			0.003
Present	21	46	
Absent	23	15	
Perineural invasion			0.196
Present	5	3	
Absent	39	58	
Vascular invasion			0.652
Present	2	3	
Absent	42	58	
In situ carcinoma			0.430
Present	16	20	
Absent	28	41	
Skin and nipple impairment			0.196
Present	5	3	
Absent	39	58	
Molecular classification			0.428
Luminal A	23	26	
Luminal B	17	22	
Luminal-HER2 and HER2	3	6	
TN Basal	1	5	

TN Non-basal	0	2	
Extracapsular invasion of SL			0.045
Present	6	18	
Absent	38	43	

TN = Triple Negative; NSL = Non-sentinel Lymph Node; SL= Sentinel Lymph Node;

Table 3. Multivariate analysis of risk factors for axillary metastasis

Variable	**OR**	**95% CI**	**p-value**
Lymphatic invasion	3.36	1.46 – 7.70	0.004
Multifocality	5.14	1.08 – 24.30	0.039
Extracapsular invasion of SL	2.65	0.95 – 7.36	0.061

SL= Sentinel Lymph Node;

Discussion

The sentinel lymph node technique is established as a trustable method for evaluating axillary status, besides causing less morbidity in the postoperative. The radical axillary dissection would be then indicated when the sentinel lymph node was positive for metastasis. However, large studies demonstrated that not all patients benefit from the dissection, especially those in the initial stages of breast cancer. Thus, researches are being executed aiming to define the clinical and pathological characteristics that predict the increased risk of lymph node metastasis, indicating the need of radical axillary dissection.

From the 105 patients included in our study, 58.1% had axillary metastasis after radical dissection, corroborating data already demonstrated in other researches, in which 30% to 60% of patients with positive sentinel lymph node also had metastatic axillary lymph nodes [8, 12-16].

Statistically significant relationship between metastasis in non-sentinel lymph nodes and tumor multifocality was also found. Patients with multiple focus of carcinoma in the same quadrant had higher risk than those ones with one tumor only (19.7% vs. 4.5%, p=0.021). Similarly, the presence of lymphatic invasion also demonstrates to increase the risk of axillary metastases (75.4% vs. 47.7%, p=0.003). Considering the characteristics of the sentinel lymph node, although the presence of extracapsular invasion was a statistically significant risk factor in univariate analysis (29.5% vs. 13.6%, p=0.045), in the multivariate analysis it did not reach statistical significance. Sample size may have contributed to this result. Otherwise, the odds of non-sentinel lymph node metastasis is 3.36 higher in the presence of lymphatic invasion compared to absence and is 5.14 higher in the presence of multifocality compared to absence (p=0,004 and p=0,039, respectively).

Researches performed so far found some similar results. Weaver et al. (2000) [25] found large relationship between tumor size and number of positive axillary lymph nodes. Posteriorly, Nos et al. (2003) [11] found relationship between size of metastasis in lymph node and the possibility of metastases in other axillary lymph nodes. In 6% of the cases where tumoral cells were identified only using the additional method of immunohistochemistry and in 7% of the cases of micrometastases identified by the usual staining, positive lymph nodes were found after dissection, compared with 39% of cases with macrometastases. However, this study could not identify a group where the chance of metastases in non-sentinel lymph nodes was remote, so that the additional axillary dissection was not indicated.

According to the same theme, Cserni et al. (2004) [13] found an increase of 62% in the risk of axillary metastasis for each centimeter of tumor, of 13% for each millimeter of the size of the metastasis in the sentinel lymph node and of 192% when there is extracapsular invasion of the lymph node. Thus, the results demonstrated that the presence of macrometastasis and of extracapsular invasion significantly increase the risk of metastasis for other lymph nodes, unlike micrometastasis or isolated tumor cells.

More recent studies have confirmed some of the findings and led to a questioning about other factors, such as degree of differentiation, histological classification and molecular classification. In the study of Zhou et al. (2012) [8] the most important factors for the presence of lymph node metastasis were tumor size, metastasis size in the sentinel lymph node and histological grade of the tumor. Regarding the molecular classification, subtypes Luminal A and Luminal B had higher risk.

Gülben et al. (2014) [19] found association between axillary metastasis and size of the primary tumor, presence of angiolymphatic invasion, histological grade and subtype of tumor. Among the subtypes, patients with Luminal HER2 and overexpression of HER2 had increased risk. One year later, Marazzo et al. (2015) [23] demonstrated positive effect of vascular and angiolymphatic invasion and tumor size and a negative effect of subtype triple negative over the presence of metastasis. Based on that, they concluded that patients with subtype triple negative and that do not have angiolymphatic invasion are not benefited from radical axillary lymphadenectomy.

Results found in this study and in other works corroborate the hypothesis that tumoral characteristics such as size, presence of lymphatic and vascular invasion, histological grade and multifocality and the extracapsular invasion of the sentinel lymph node have significant relationship with the axillary status. However, the molecular classification is not yet well defined, since results from researches were divergent until this moment [8, 19, 21 – 23].

Limitations of our study include the sample size, the retrospective character and not specifying the metastasis size in the sentinel lymph node. However, the findings corroborate what was demonstrated in other researches. Thus, it is important that new studies are carried out with a larger sample in order to establish not only the risk of lymph node metastatic disease, but also the precise indication of the radical axillary dissection, in order to optimize the treatment of patients and to proportionate a better quality of life.

References

1. Buitrago F, Uemura G, Sena MCF. Fatores prognósticos em câncer de mama. Com. Ciências Saúde. 2011; 22 Sup 1:S69-S82.
2. Reeder-Hayes KE, Bainbridge J, Meyer AM, Amos KD, Weiner BJ, Godley PA, *et al*. Race and age disparities in receipt of sentinel lymph node biopsy for early-stage breast cancer. Breast Cancer Res Treat. 2011;128(3):863–871.
3. Andree C, Schmidt VJ, Munder BIJ, Seidenstücker K, Behrendt P, Witzel C *et al*. Detecting of breast cancer metastasis by means of regional lymph node sampling during autologous breast reconstruction – a screening of 519 consecutive patients. Med Sci Monit. 2012;18(10):CR605-610.
4. Vohra LM, Gulzar R, Saleem O. Intra operative frozen examination of sentinel lymph node in breast câncer. J Ayub Med Coll Abbottabad. 2015 Jan-Mar;27(1):40-4.
5. Yildiz R, Urkan M, Hancerliogulları O, Kılbaş Z, Ozturk E, Mentes MO, *et al*. Comparison of five different popular scoring systems to predict nonsentinel lymph node status in patients with metastatic sentinel lymph nodes: a tertiary care center experience. SpringerPlus (2015) 4:651. DOI 10.1186/s40064-015-1442-4.
6. Gournay ED, Guyomard A, Coutant C, Boulet S, Arveux P, Causeret S *et al*. Impact of sentinel node biopsy on long-term quality of life in breast cancer patients. British Journal of Cancer. 2013;109,2783-2791.
7. Geertsema D, Gobardhan PD, Madsen EVE, Albregts M, van Gorp J, Hooge P *et al*. Discordance of Intraoperative Frozen Section Analysis with Definitive Histology of Sentinel Lymph Nodes in Breast Cancer Surgery: Complementary Axillary Lymph Node Dissection is Irrelevant for Subsequent Systemic Therapy. Ann Surg Oncol. 2010; 17:2690–2695.
8. Zhou W, He Z, Xue J, Wang M, Zha X, Ling L *et al*. Molecular Subtype Classification Is a Determinant of Non-Sentinel Lymph Node Metastasis in Breast Cancer Patients with Positive Sentinel Lymph Nodes. PLoS ONE. 2012;7(4): e35881.
9. Miller CL, Specht MC, Scolny MN, Jammallo LS, Horick N, O`Toole J, *et al*. Sentinel lymph node biopsy at the time of mastectomy does not increase the risk of lymphedema: implications for prophylactic surgery. Breast Cancer Res Treat. 2012; 135(3):781–789.
10. Turner R, Ollila W, Krasne D, Giuliano A. Histopathologic Validation of the Sentinel Lymph Node Hypothesis for Breast Carcinoma. Ann. Surg. 1997. Vol. 226, No. 3, 271-278.
11. Nos C, Harding-MacKean C, Fréneaux P, Trie A, Falcou MC, Sastre-Garau X *et al*. Prediction of tumour involvement in remaining axillary lymph nodes when the sentinel node in a woman with breast cancer contains metastases. Br J Surg. 2003.90: 1354–1360.
12. Cserni G, Amendoeira I, Apostolikas N. Discrepancies in current practice of pathological evaluation of sentinel lymph nodes in breast câncer: results of a questionnaire based survey by the European Working Group for Breast Screening Pathology. J Clin Pathol. 2004; 57(7):695-701.
13. Cserni G, Burzykowski T, Vinh-Hung V, Kocsis L, Boross G, Sinko M *et al*. Axillary Sentinel Node and Tumour-related Factors Associated with Non-

sentinel Node Involvement in Breast Cancer. Jpn J Clin Oncol 2004; 34(9)519–524.

14. Francissen CMTP, Dings PJM, van Dalen T, Strobbe LJA, van Laarhoven HWM, Wilt JHW. Axillary Recurrence After a Tumor-Positive Sentinel Lymph Node Biopsy Without Axillary Treatment: A Review of the Literature. Ann Surg Oncol. 2012; 19:4140–41.
15. Verry H, Lord SJ, Martin A, Gill G, Lee CK, Howard K *et al*. Effectiveness and cost-effectiveness of sentinel lymph node biopsy compared with axillary node dissection in patients with early-stage breast cancer: a decision model analysis. British Journal of Cancer.2012; 106:1045 – 1052.
16. Tvedskov TF, Jensen M, Lisse IM, Ejlertsen B, Balsley B, Kroman N. High risk of non-sentinel node metastases in a group of breast cancer patients with micrometastases in the sentinel node. Int. J. Cancer. 2012:131,2367–2375.
17. Giuliano AE, Hunt KK, Ballman KV, Beitsch PD, Whitworth PW, Blumencranz PW *et al*. Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis: a randomized clinical trial. JAMA 2011;305:569–75.
18. Giuliano AE, McCall L, Beitsch P, Whitworth PW, Blumencranz P, Leitch AM *et al*. Locoregional recurrence after sentinel lymph node dissection with or without axillary dissection in patients with sentinel lymph node metastases: the American College of Surgeons Oncology Group Z0011 randomized trial. Ann Surg 2010;252:426–32; discussion 32-3.
19. Gülben K, Berberoğlu U, Aydoğan O, Kınaş V. Subtype Is a Predictive Factor of Nonsentinel Lymph Node Involvement in Sentinel Node-Positive Breast Cancer Patients. J Breast Cancer. 2014;17(4):370-37.
20. Van La Parra RFD, de Wilt JHW, Mol SJJ, Mulder H, Roos WQ, K Bosscha. Is SLN Biopsy Alone Safe in SLN Positive Breast Cancer Patients? The Breast Journal, Volume 21 Number 6, 2015: 621–626.
21. Ganaraj A, Kuhn JA, Jones RC, Grant MD, Andrews V, Knox S, *et al*. Predictors for nonsentinel node involvement in breast cancer patients with micrometastases in the sentinel lymph node. BUMC proceedings. 2003; 16:3–6.
22. Reyal F, Belichard C, Rouzier R, de Gournay E, Senechal C, Bidard FC, *et al*. Non-sentinel lymph node metastasis prediction in breast cancer with metastatic sentinel lymph node: impact of molecular subtypes classification. PLoS One 2012; 7:e47390.
23. Marrazzo A, Boscaino G, Marrazzo E, Taormina P, Toesca A. Breast cancer subtypes can be determinant in the decision making process to avoid surgical axillary staging: A retrospective cohort study. Int J Surg, 2015;S1743-9191(15)01074-2.
24. Turner R, Ollila W, Krasne D, Giuliano A. Histopathologic Validation of the Sentinel Lymph Node Hypothesis for Breast Carcinoma. Ann. Surg. 1997. Vol. 226, No. 3, 271-278.
25. Weaver DL, Krag DN, Ashikaga T, Harlow SP. O´Connell M. Pathologic analysis of sentinel and nonsentinel lymph nodes in breast carcinoma. Cancer, 2000. 88:1099–1107.

4. Considerações finais

Este estudo faz parte de uma pesquisa maior, intitulada Estudo dos marcadores tumorais no câncer de mama, aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da ISCMPA (parecer número 525.170) de acordo com a Resolução 466/2012 do CNS/MS. Esta iniciou em 2013, com o objetivo de investigar os marcadores preditivos no câncer de mama, visando contribuir com informações sobre o perfil das pacientes e as características do tumor, correlacionando ao prognóstico e à sobrevida.

Sabe-se que o estado linfonodal é o fator prognóstico mais importante, além de estar intimamente relacionado com a sobrevida no câncer de mama. A técnica do linfonodo sentinela está estabelecida como um método confiável para avaliar o *status* axilar, além de causar menor morbidade no pós-operatório. O esvaziamento axilar radical estaria então indicado quando o linfonodo sentinela fosse positivo para metástase. Entretanto, grandes estudos demonstraram que nem todos os pacientes se beneficiam do esvaziamento, principalmente aqueles em estágios iniciais do câncer de mama. Sendo assim, pesquisas vêm sendo realizadas no sentido de definir as características clínicas e histopatológicas que predizem o risco aumentado de metástase linfonodal, indicando a necessidade do esvaziamento axilar radical.

Os resultados encontrados no presente estudo e em outros trabalhos confirmam a hipótese de que algumas características tumorais, como tamanho no maior eixo, multifocalidade, invasão linfática e vascular e grau histológico, e do linfonodo sentinela, como tamanho da metástase e invasão extracapsular, possuem relação significativa com o *status* axilar. No entanto, a influência da classificação molecular ainda não está bem definida, uma vez que os resultados das pesquisas foram divergentes até o momento.

As limitações do nosso estudo incluem o tamanho da amostra, o caráter retrospectivo e a não especificação do tamanho da metástase no linfonodo sentinela. Entretanto, os achados corroboram o que foi demonstrado em outras pesquisas. Dessa forma, é importante que novos estudos com uma amostra maior sejam feitos a fim de que se possa estabelecer não só o risco de doença linfonodal metastática, mas também a indicação precisa do esvaziamento axilar radical, garantindo o melhor tratamento e proporcionando melhor qualidade de vida para as pacientes.

5. Anexos

5.1. Pathology & Oncology Research - Instructions for authors

Aims and Scope

Pathology & Oncology Research (POR) is an interdisciplinary Journal at the interface of pathology and oncology including the preclinical and translational research, diagnostics and therapy. Furthermore, POR is an international forum for the rapid communication of reviews, original research, critical and topical reports with excellence and novelty. Published quarterly, POR is dedicated to keeping scientists informed of developments on the selected biomedical fields bridging the gap between basic research and clinical medicine. It is a special aim for POR to promote pathological and oncological publishing activity of colleagues in the Central and East European region. The journal will be of interest to pathologists, and a broad range of experimental and clinical oncologists, and related experts. POR is supported by an acknowledged international advisory board and the Arányi Fundation for modern pathology.

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

- LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].

2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].

3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

- Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. Eur J Appl Physiol 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. N Engl J Med 965:325–329

- Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. J Mol Med. doi:10.1007/s001090000086

- Book

South J, Blass B (2001) The future of modern genomics. Blackwell, London

- Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) The rise of modern genomics, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

- Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1. Accessed 26 June 2007

- Dissertation

Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

- ISSN.org LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

- EndNote style (zip, 2 kB)

Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibtex file spbasic.bst which is included in Springer's LaTeX macro package.

Tables

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Ethical Responsibilities of Authors

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation can be achieved by following the rules of good scientific practice, which include:

- The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration.
- The manuscript has not been published previously (partly or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work (please provide transparency on the re-use of material to avoid the hint of text-recycling (“self-plagiarism”)).
- A single study is not split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (e.g. “salami-publishing”).
- No data have been fabricated or manipulated (including images) to support your conclusions
- No data, text, or theories by others are presented as if they were the author’s own (“plagiarism”). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks are used for verbatim copying of material, and permissions are secured for material that is copyrighted.

Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.

- Consent to submit has been received explicitly from all co-authors, as well as from the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute/organization where the work has been carried out, **before** the work is submitted.

- Authors whose names appear on the submission have contributed sufficiently to the scientific work and therefore share collective responsibility and accountability for the results.

In addition:

- Changes of authorship or in the order of authors are not accepted after acceptance of a manuscript.
- Requesting to add or delete authors at revision stage, proof stage, or after publication is a serious matter and may be considered when justifiably warranted. Justification for changes in authorship must be compelling and may be considered only after receipt of written approval from all authors and a convincing, detailed explanation about the role/deletion of the new/deleted author. In case of changes at revision stage, a letter must accompany the revised manuscript. In case of changes after acceptance or publication, the request and documentation must be sent via the Publisher to the Editor-in-Chief. In all cases, further documentation may be required to support your request. The decision on accepting the change rests with the Editor-in-Chief of the journal and may be turned down. Therefore authors are strongly advised to ensure the correct author group, corresponding author, and order of authors at submission.
- Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results. This could be in the form of raw data, samples, records, etc.

If there is a suspicion of misconduct, the journal will carry out an investigation following the COPE guidelines. If, after investigation, the allegation seems to raise valid concerns, the accused author will be contacted and given an opportunity to address the issue. If misconduct has been established beyond reasonable doubt, this may result in the Editor-in-Chief's implementation of the following measures, including, but not limited to:

- If the article is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.
- If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction, either an erratum will be placed with the article or in severe cases complete retraction of the article will occur. The reason must be given in the published erratum or retraction note.
- The author's institution may be informed.

5.2. Parecer do Comitê de Ética da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA)

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo dos marcadores tumorais no câncer de mama.
Pesquisador: Claudia Giuliano Bica
Área Temática:
Versão: 5
CAAE: 22396713.1.0000.5335
Instituição Proponente: Irmandade da Santa Casa de Misericordia de Porto Alegre - ISCMPA
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 901.915
Data da Relatoria: 26/11/2014

Apresentação do Projeto:
Conforme anteriormente descrito no Parecer Consubstanciado do CEP.

Objetivo da Pesquisa:
Objetivo da Emenda:

A inclusão das co-investigadoras: Renata Fragomeni Almeida, Suzana Elisabete Lamonatto e Karen Margarita Rico Escamilla.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:
Descritos e adequados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:
Conforme anteriormente descrito no Parecer Consubstanciado do CEP.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:
Conforme anteriormente descrito no Parecer Consubstanciado do CEP.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:
Não se aplica.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Após a avaliação da solicitação a emenda da inclusão de co-investigador referente ao estudo acima descrito, o presente Comitê não encontrou óbices quanto à implementação das mesmas.

PORTO ALEGRE, 08 de Dezembro de 2014

Assinado por:
Claudio Teloken
(Coordenador)

Endereço: R. Profº Annes Dias,285 Hosp.Dom Vicente Scherer
Bairro: 6º andar - Centro **CEP:** 90.020-090
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3214-8571 **Fax:** (51)3214-8571 **E-mail:** cep@santacasa.tche.br