

## Significato biologico delle micrometastasi linfonodali e del concetto di linfonodo sentinella

A. FORTE, G. LEONETTI, M. BOSCO, S. MANFREDELLI, R. DE SANCTIS, V. URBANO, M. BEZZI

**RIASSUNTO:** Significato biologico delle micrometastasi linfonodali e del concetto di linfonodo sentinella.

A. FORTE, G. LEONETTI, M. BOSCO, S. MANFREDELLI, R. DE SANCTIS, V. URBANO, M. BEZZI

*Le micrometastasi, ossia le metastasi < 2 mm, sono state oggetto di diversi studi. In letteratura è documentato un peggioramento prognostico dovuto alla loro presenza.*

*La possibilità della loro ricerca nel linfonodo sentinella è pertanto di grande interesse perché consente un'applicazione clinica con un buon rapporto costo-efficacia.*

*Gli Autori, individuato il linfonodo sentinella e accertata la presenza in esso di micrometastasi, si interrogano sul loro impatto clinico, prognostico e terapeutico.*

**SUMMARY:** The clinical significance of lymph node micrometastases and of concept of sentinel lymph node.

A. FORTE, G. LEONETTI, M. BOSCO, S. MANFREDELLI, R. DE SANCTIS, V. URBANO, M. BEZZI

*Micrometastases, (metastases smaller than 2 mm), had been subject of several studies. In literature is documented a prognostic worsening due to their presence.*

*Research of micrometastases in sentinel lymph node is of great interest and can allow a clinical application with profitable cost efficacy ratio.*

*The Authors discuss about clinical, prognostical and therapeutical implications in case of micrometastases into sentinel lymph nodes.*

KEY WORDS: Micrometastasi linfonodali - Linfonodo sentinella - Immunoistochimica.  
Lymph node micrometastases - Sentinel lymph node - Immunoistochemical.

### Introduzione

In chirurgia oncologica il concetto di radicalità si riferisce soprattutto ad una completa exeresi della massa neoplastica primitiva, con margini di resezione indenni, e dei linfonodi locoregionali.

Lo stadio della neoplasia al momento della terapia chirurgica rappresenta il principale parametro prognostico. In particolare, il significato prognostico è correlato ad alcune variabili istopatologiche: istotipo, grado di differenziazione, pattern di crescita, infiltrazione linfocitaria peritumorale e presenza di invasione venosa (1).

Il coinvolgimento metastatico linfonodale rappresenta il fattore prognostico di maggiore importanza

dopo l'asportazione chirurgica del tumore; un elevato numero di linfonodi metastatici è inversamente proporzionale alla possibilità di sopravvivenza. I pazienti con metastasi linfonodali rientrano in un gruppo a prognosi peggiore sia dal punto di vista del periodo libero da malattia che della sopravvivenza postoperatoria (1). Tuttavia anche dopo radicalità dell'atto chirurgico (R0) e negatività per metastasi linfonodali pN0 si verifica un 15-30% di ripresa di malattia con di recidiva entro i 5 anni ed accorciamento della sopravvivenza (1-4).

Convenzionalmente, l'esame anatomico-patologico dei linfonodi viene eseguito colorando con ematossilina-eosina una singola sezione di ogni linfonodo; in tal caso è stato calcolato che l'esame istologico è in grado di valutare una minima parte del tessuto linfonodale circa l'1%. La probabilità di reperire cellule tumorali nel tessuto linfonodale è direttamente proporzionale alla quantità di tessuto analizzato sulla base del numero di sezioni e all'uso di metodiche e marcatori più

Università degli Studi "La Sapienza" di Roma  
Azienda Policlinico Umberto I  
Dipartimento di Scienze Chirurgiche e Tecnologie Mediche Applicate  
U.O.C. Chirurgia Generale H  
(Primario: Prof. M. Bezzi)

© Copyright 2006, CIC Edizioni Internazionali, Roma

sensibili di quelli tradizionali basati sulle colorazioni classiche. A migliorare l'accuratezza della analisi del tessuto linfonodale sono intervenute l'immunoistochimica e le tecniche di biologia molecolare che si avvalgono dell'utilizzo di anticorpi monoclonali diretti contro proteine cellulari epiteliali (normalmente assenti nel tessuto linfonodale) o contro antigeni tumorali, ovvero l'utilizzo come marcatore della guanidil-ciclastasi e la ricerca di geni mutanti (k-ras e p53) (5-8).

Tuttavia tali metodiche comportano un incremento sia dei costi sia d'impiego di risorse umane. Si comprende quindi la necessità di giustificare l'applicazione di tali metodiche solo nell'ambito di studi controllati o a fronte di un sicuro vantaggio terapeutico. Attualmente la possibilità di individuare un linfonodo "sentinella" apre nuove prospettive consentendo l'impiego delle metodiche immunoistochimiche e/o di biologia molecolare in maniera mirata su una singola stazione linfonodale, ottenendo un'applicazione clinica con un buon rapporto costo-efficacia. Gli Autori, dopo averne messo a punto la tecnica di individuazione (9), si interrogano sul significato clinico e prognostico della presenza di micrometastasi nel linfonodo sentinella.

## Pazienti e metodi

Lo studio ha preso in esame 48 pazienti consecutivi, 27 di sesso maschile e 21 di sesso femminile, di età compresa tra 45 e 78 anni, così suddivisi in base all'organo sede della neoplasia: 18 adenocarcinomi (adc) gastrici, 16 adenocarcinomi (adc) del colon e 14 neoplasie polmonari.

In nessun paziente le indagini preoperatorie strumentali hanno documentato metastasi linfonodali o a distanza. In tutti è stata attuata la identificazione del linfonodo sentinella mediante la colorazione vitale con Blu Patent.

In 34 pazienti è stato identificato almeno un linfonodo sentinella e precisamente in 13 adc gastrici, 10 adc del colon e 11 neoplasie polmonari.

I linfonodi identificati sono stati fissati in formalina tamponata al 10% ed inviati, a parte, insieme al restante pezzo operatorio per l'esame istologico definitivo.

## Risultati

Dei 34 pazienti con linfonodo sentinella identificato, 16 sono risultati N0, 12 N1 e 6 N2. I 16 pazienti N0 comprendevano 7 adc gastrici, 4 adc del colon e 5 neoplasie polmonari.

Per ciascun linfonodo dei 16 N0 sono state allestite 20 sezioni di 4 µc di spessore e per l'individuazione di cellule neoplastiche ci si è avvalsi della immunoistochimica, ovvero di una miscela di anticorpi monoclonali anticitocheratina AE-1, AE-3 e, come sistema di rilevazione della reazione, della tecnica standard ABC (complesso aviotina-biotina-perossidasi).

In 2 dei 16 N0 (12.5%) l'utilizzo di sezioni multiple e l'immunoistochimica hanno permesso di identificare la presenza di micrometastasi e precisamente in 1 adc gastrico e in 1 adc polmonare.

## Discussione

L'interessamento linfonodale al momento della diagnosi di neoplasia ha un impatto prognostico fondamentale. Esiste, infatti, un rapporto di correlazione inversa tra numero di linfonodi metastatici ed evoluzione favorevole della malattia. Tuttavia accade che in taluni casi una percentuale variabile di pazienti, pur sottoposti ad interventi chirurgici radicali (margini di resezione indenni e assenza di metastasi linfonodali), sviluppi successivamente una ripresa di malattia con sopravvivenza sovrapponibile ai pazienti con metastasi linfonodali documentate (pN1) (1, 2, 10).

Indubbiamente c'è qualcosa che sfugge alla normale tipizzazione e che non permette una valutazione appropriata del grado di compromissione sistemica della neoplasia. La presenza di metastasi linfonodali "miconosciute" può probabilmente coincidere con una diffusione neoplastica sistemica più o meno manifesta e quindi influenzare nel tempo la effettiva prognosi.

Studi recenti con metodiche immunoistochimiche o molecolari condotte su sezioni linfonodali seriate hanno confermato la presenza di micrometastasi in una percentuale variabile (10-80%) a seconda della tecnica utilizzata ed in relazione alla aggressività biologica del tumore (pancreas>esofago>mammella) (12-14).

In letteratura si discute sul significato clinico e prognostico delle micrometastasi (15, 16). I primi studi sembravano non dimostrare peggioramenti clinici dovuti alla presenza di micrometastasi (17-22) e il *John Wayne Cancer Center* e il *College of American Pathologist* concordano per la non significatività delle metastasi riscontrate con lo studio immunoistochimico o molecolare e non ne raccomandano l'applicazione routinaria.

Studi più recenti hanno però smentito i risultati iniziali. Infatti, sulla base di un follow up di almeno 10 anni, in pazienti T1 portatori di micrometastasi si è documentata una prognosi peggiore (11, 23-27) e in uno studio condotto da Liefers et al. (28) la sopravvivenza a 5 anni in pazienti pN0 è stata del 91% senza micrometastasi rispetto al 50% con micrometastasi (p=0.02).

Per quanto riguarda invece la significatività prognostica negativa delle micrometastasi di dimensioni inferiori a 0.2 mm, soprattutto in assenza dei caratteri di attività maligna (proliferazione o reazione stromale), ancora permangono dei dubbi. Piccoli agglomerati di cellule neoplastiche o addirittura una singola cellula possono essere distrutti dal sistema immunitario dell'

ospite oppure rimanere silenti per poi successivamente moltiplicarsi o accrescersi e diffondersi. I motivi per cui alcuni foci possono rimanere relativamente "dormienti", come postula Clayton, ed altri dimostrino una crescita aggressiva non sono stati ancora chiariti (11).

Ulteriori evidenze hanno permesso di valutare che la presenza di micrometastasi nel carcinoma coloretta- le rende i pazienti ad alto rischio di recidiva e per tale motivo essi trarrebbero beneficio da una terapia adiuvante sistemica (29). Pertanto alcuni autori, proprio in relazione alla presenza di micrometastasi, propongono una diversa stadiazione dei pazienti e ipotizzano che un 20-40% di essi dallo stadio B possa essere riclassificato in stadio C (30-32).

In accordo a tali esigenze l'AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) ha recentemente rivisto la stadiazione TNM apportando alcune modifiche (33). È stato innanzitutto abbassato, in ordine dimensionale, il limite inferiore delle micrometastasi, definendo due classi: micrometastasi di dimensioni comprese tra 0,2 e 2,0 mm, stadiate pN1mi, e micrometastasi inferiori a 0,2 mm, costituite in pratica da una singola cellula, stadiate pN0; inoltre, se la stadiazione è basata sul linfonodo sentinella, viene aggiunto (SN) alla classificazione pN.

Relativamente alla possibilità, invero non ancora comprovata, che la presenza di micrometastasi inferiori a 0,2 mm comporti un peggioramento prognostico, esse sono indicate pN0(i+) se l'immunoistochimica è positiva e pN0(i-) se l'immunoistochimica è negativa.

Nei pazienti già classificati pN1 con le tecniche istologiche tradizionali, l'impatto della ristadiazione appare modesto e tale da non giustificare l'utilizzo di metodiche più costose. La presenza di metastasi occulte andrebbe ricercata qualora questo reperto possa alterare la prognosi e la strategia terapeutica, quindi nei

pazienti già classificati pN0 con le tradizionali tecniche istologiche.

Ovviamente la ricerca di micrometastasi non può essere condotta alla cieca perché implicherebbe costi non giustificabili. Invece, l'individuazione, l'asportazione e la ricerca di micrometastasi limitatamente alla prima stazione linfonodale drenante la neoplasia (linfonodo sentinella) permettono un'applicazione clinica con un buon rapporto costo/efficacia.

Il nostro studio, seppure limitato, permette di identificare la prima stazione drenante la neoplasia (linfonodo sentinella) in modo che, se alla normale procedura di stadiazione non dovesse risultare la presenza di metastasi (pN0), si può procedere ad un suo studio più accurato con sezioni pluriseriate e colorazione immunoistochimica per la loro ricerca. Con tale condotta in 2 di 16 pazienti pN0 abbiamo riscontrato la presenza di micrometastasi (12.5%). La tecnica è risultata di semplice attuazione e di costi contenuti quando mirata al linfonodo sentinella dei casi pN0.

## Conclusioni

In conclusione possiamo affermare che anche oltre il 30% dei pazienti considerati pN0 (7-33%) presenta metastasi linfonodali occulte che si possono evidenziare tramite sezioni seriate multiple e metodiche di immunoistochimica; i pazienti con micrometastasi linfonodali hanno una prognosi clinica sovrapponibile a quella dei pazienti pN1, quindi la loro presenza è indice, come per le macrometastasi, di aggressività neoplastica. Una più accurata ricerca di metastasi linfonodali occulte nel linfonodo sentinella può essere utile per una migliore valutazione prognostica e terapeutica del paziente a costi contenuti.

## Bibliografia

1. Forte A, Urso D et al. Indicatori prognostici della patologia tumorale di tipo epiteliale del grosso intestino. *Ann Ital Chir* 2002; 6: 587-595.
2. Perracchia A, Bonavina L. Carcinoma del cardias. Collana monografica della Società Italiana di Chirurgia. Roma: Studio Tipografico SP. 1999; 12.
3. Fisher B et al. Relation of number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer: an NSABP update. *Cancer* 1993; 52: 1551-1557.
4. Rosen PP et al. Predictors of recurrence in Stage I (T1N1M0) breast carcinoma. *Ann Surg* 1981; 193: 15-25.
5. Greenon JK, Rice R et al. Identification of occult micrometastases in pericolic lymph nodes of Duke's B colorectal patients using monoclonal antibodies against cytokeratin and CC49. Correlation with long-term survival. *Cancer* 1994; 73: 563-69.
6. Merrie AEH, Dennett ER et al. Prognostic significance of occult metastases in colon cancer. *Dis Colon Rectum* 2003; 46: 221-31.
7. Scheunemann P, Izbichi JR. Tumorigenic potential of apparently tumor-free lymph node. *N Engl J Med* 1999; 340: 1687.
8. Hosch S, Kraus J, Scheneemann P et al. Malignant potential and cytogenetic characteristic of occult disseminated tumor cells in esophageal cancer. *Cancer Research* 2000; 60: 6836-40.
9. Forte A, Urso D, Bezzi M et al. Mappatura linfonodale intraoperatoria in tumori gastrici polmonari e del grosso intestino. La tecnica del linfonodo sentinella. *G Chir* 2004; 25: 101-4.

10. Bilchik AJ, Saha S et al. Molecular staging of early colon cancer on the basis of sentinel node analysis: a multicentric phase II trial. *J Clin Oncol* 2001; 19: 1128-36.
11. Clayton F et al. Pathologic correlates of prognosis in lymph nodes positive breast carcinoma. *Cancer* 1993; 71(5): 1780-90.
12. Izbiki JR, Hosch SB et al. Prognostic value of immunohistochemically identifiable tumor cells in lymph nodes of patients with completely resected esophageal cancer. *N Engl J Med* 1997; 337: 1188-94.
13. Gusterson B, Ott R. Occult axillary lymph node metastases in breast cancer. *Lancet* 1990; 336: 434-435.
14. Demeure MJ, Komorowski RA et al. Adenocarcinoma of the pancreas: detection of occult metastases in regional lymph nodes by a polymerase chain reaction-based assay. *Cancer* 1998; 83: 1328-34.
15. Glickmann JN, Wang HH et al. The prognostic significance of lymph node micrometastases in patients with esophageal carcinoma. *Cancer* 1999; 86: 1883-4.
16. Jiao X, Krasna MJ. Clinical significance of lymph node micrometastasis in lung and esophageal cancer: a new paradigm in thoracic oncology. *Ann Thorac Surg* 2002; 74: 278-84.
17. Huvos AG et al. Significance of macrometastases and micrometastases in mammary cancer. *Ann Surg* 1971; 173(1): 44-46.
18. Pickren JW et al. Significance of occult metastases. A study of breast cancer. *Cancer* 1961; 14: 1266-71.
19. Fisher ER et al. Detection and significance of occult axillary node metastases in patients with invasive breast cancer. *Cancer* 1978; 42: 2025-31.
20. Attiyeh FF et al. Axillary micrometastases and macrometastases in carcinoma of the breast. *Surg Gynecol Obst* 1997; 144(6):839-42.
21. Hansen NM et al. Clinical significance of axillary micrometastases in breast cancer: How small is too small? *Proc ASCO* 2001; 20: 249.
22. Fitzgibbons PL et al. Prognostic factors in breast cancer: College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124: 966-78.
23. Friedman S et al. Importance of tumor cells in axillary node sinus margins (clandestine metastases) discovered by serial sectioning in operable breast cancer. *Acta Oncol* 1998; 27(5): 483-87.
24. Nasser IA et al. Occult axillary lymph node metastases in <node-negative> breast carcinoma. *Hum Pathol* 1993; 24(9): 950-57.
25. International (LUDWIG) Breast Cancer Study Group. Prognostic importance of occult axillary lymph node micrometastases from breast cancers. *Lancet* 1990; 335: 1565-68.
26. Greenson JK, Rice R et al. Identification of occult micrometastases in pericolic lymph nodes of Duke's B colorectal patients using monoclonal antibodies against cytokeratin and CC49. Correlation with long-term survival. *Cancer* 1994; 73: 563-69.
27. Yusuda K, Shiraishi N et al. Pattern of lymph node micrometastasis and prognosis of patients with colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2001; 8: 300-4.
28. Liefers GJ, et al. Micrometastases and survival in stage II colorectal cancer. *N Engl J Med* 1998; 339: 223-28.
29. Merrie AEH et al. Prognostic significance of occult metastases in colon cancer. *Dis Colon Rectum* 2003; 46: 221-231.
30. Waldman SA, Rakitic J et al. Use of guanidyl cyclase C for detecting micrometastases in lymph nodes of patients with colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 1998; 41: 310-15.
31. Liu Z, Ye X et al. Detection of occult metastases in lymph nodes from patients with colorectal carcinoma by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Chin Med J* 2002; 115(4): 529-31.
32. Bustin SA et al. Development of a molecular metastasis index for colorectal cancer. *Br J Surg* 2002; 89(s1): 69-69.
- 33) American Joint Committee on Cancer: *AJCC Cancer Staging Manual*, 6<sup>th</sup> edition 2003.