

M

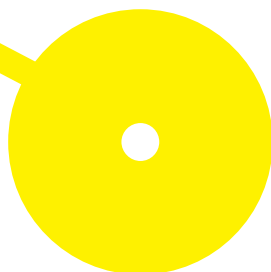
MESTRADO

TÉCNICAS LABORATORIAIS EM BIOPATOLOGIA; RAMO PATOLOGIA MOLECULAR

Análise de Gânglios Sentinela em Cancro da Mama: O Papel do Ensaio OSNA[®] na Caracterização das Micrometástases e Macrometástases

Catarina Oliveira Teixeira

10/2022





**ESCOLA
SUPERIOR
DE SAÚDE**



**Análise de Gânglios Sentinela em Cancro da Mama: O Papel do Ensaio OSNA®
na Caracterização das Micrometástases e Macrometástases**

Autor

Catarina Oliveira Teixeira

Orientadores

Professora Doutora Regina Augusta Alves Pereira da Silva
Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto

Professora Doutora Ana Filipa Quintela Vieira
Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto

**Dissertação apresentada para cumprimento dos
requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em
Técnicas Laboratoriais em Biopatologia – Área de
Especialização em Patologia Molecular pela Escola
Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.**

Agradecimentos

Este trabalho é o resumo de dois anos de aprendizagem, dedicação e superação. Gostaria de agradecer a todos aqueles que, de alguma forma, permitiram que esta tese se concretizasse.

À minha orientadora, Professora Doutora Regina Silva, pela disponibilidade e por todos os conhecimentos transmitidos ao longo deste processo.

À Professora Doutora Filipa Vieira, obrigada pela orientação e pela forma descomplicada com que proporciona a aprendizagem, por me ensinar que simplificar muitas vezes é a melhor forma de fazer um bom trabalho.

À Marta Santos, pela total disponibilidade e dedicação desde o primeiro momento até ao último. Por acreditar em mim e por ter sempre uma palavra de encorajamento. Um enorme obrigada!

À Professora Sandra Alves pelo apoio estatístico indispensável na concretização deste trabalho.

Ao Serviço de Anatomia Patológica da ULSM, EPE – Hospital Pedro Hispano, agradeço por me ter permitido realizar este trabalho e, aos Técnicos um enorme obrigada por todos os conhecimentos que me transmitiram e pela amabilidade para comigo.

Ao Técnico Amaro, o meu muito obrigada por toda a disponibilidade e carinho com que sempre me recebe. É uma pessoa genuinamente boa.

À Cátia e à Daniela, obrigada por todos os bons momentos juntas e por vos ter trazido do trabalho para a vida pessoal.

À minha amiga Telma, a minha companheira de estudos desde a licenciatura, dona de uma perseverança e persistência indestrutíveis que me deu motivação para não desistir.

À minha colega de Mestrado Ana Gouveia, pela companhia na tempestade e na bonança.

Aos meus amigos mais próximos por compreenderem a minha ausência nos momentos mais difíceis desta etapa e quererem sempre o meu sucesso.

O meu maior agradecimento não poderia deixar de ser para o meu núcleo familiar, por todos os valores que me transmitiram, por me apoiarem incondicionalmente e por serem o meu porto seguro. Aos meus Pais, pelo exemplo de força e determinação, pelo amor incondicional e por viajarem até ao fim do mundo por mim. Ao Eduardo, pela amizade, companheirismo e por todo o amor. Amo-vos!

A todos, obrigada!

Resumo

Em 2020, o cancro da mama foi o tumor maligno com maior incidência mundial e o segundo mais letal. O OSNA® classifica a presença de metástases no gânglio sentinela como micrometástases ou macrometástases. Este método apresenta alta sensibilidade e especificidade e permite auxiliar a decisão terapêutica de realizar ou não o esvaziamento ganglionar axilar, com o objetivo de diminuir a morbidade associada.

O principal objetivo deste trabalho foi conhecer a realidade dos casos em que se realizou OSNA® no Hospital Pedro Hispano, analisar e interpretar os dados para implementar melhorias nos procedimentos. Um total de 79 pacientes com metástases no gânglio sentinela detetadas pelo OSNA® foram incluídas no estudo.

A análise permitiu confirmar que o OSNA® é uma metodologia segura na deteção de metástases ganglionares quando comparada à técnica convencional, principalmente para a deteção de micrometástases. No entanto, não se verificou nenhum padrão que determinasse um perfil característico do tipo de metastização do gânglio sentinela pelo OSNA®.

Um estudo futuro que integre todas as pacientes com cancro da mama que realizaram o ensaio molecular OSNA® permitirá compreender melhor os perfis clínicos e anatomopatológicos dos tumores associando ao resultado do OSNA®.

Palavras-chave: Cancro da Mama; OSNA; Micrometástase; Macrometástase; Gânglio sentinela.

Abstract

In 2020, breast cancer was the malignant tumor with the highest incidence worldwide and the second most lethal. OSNA® classifies the presence of sentinel node metastases as micrometastases or macrometastases. This method has high sensitivity and specificity and can help in the therapeutic decision of whether or not to perform axillary lymph node dissection, with the aim of reducing associated morbidity.

The main objective of this work was to know the reality of the cases in which OSNA® was performed at Hospital Pedro Hispano, analyze and interpret the data to implement improvements in the procedures. A total of 79 patients with OSNA® detected sentinel node metastases were included in the study.

The analysis confirmed that OSNA® is a safe methodology in the detection of lymph node metastases when compared to the conventional technique, mainly for the detection of micrometastases. However, no pattern was found that determined a characteristic profile of the type of sentinel node metastasis by OSNA®.

A future study that includes all breast cancer patients who underwent the OSNA® molecular assay will allow a better understanding of the clinical and anatomopathological profiles of the tumors associated with the OSNA® result.

Keywords: Breast cancer; OSNA; Micrometastasis; Macrometastasis; Sentinel node.

Índice

1. Introdução.....	1
1.1. O Cancro da Mama.....	1
1.2. Classificação histológica.....	3
1.3. Classificação molecular.....	6
1.4. Terapia mamária.....	8
1.5. Gânglio sentinela	8
1.6. <i>One Step Nucleic Acid Amplification</i>	9
1.7. Micrometástase e macrometástase	11
2. Objetivos.....	13
3. Materiais e Métodos	14
3.1. Amostra	14
3.2. Realização do exame extemporâneo e OSNA®.....	15
3.3. Análise estatística.....	15
4. Resultados.....	16
4.1. Caracterização da amostra.....	16
4.2. Caracterização dos tumores	17
4.3. Caracterização do exame extemporâneo.....	18
4.4. Associação do resultado do ensaio OSNA® com os dados clinicopatológicos.....	21
5. Discussão.....	24
6. Conclusão.....	29
7. Referências Bibliográficas	30

Índice de Abreviaturas e Acrónimos

AJCC – American Joint Committee on Cancer

ASCO – American Society of Clinical Oncology

BRCA – Breast Cancer gene

CDIS – Carcinoma Ductal in Situ

cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar, do inglês Complementary

Desoxyribonucleic Acid

CK19 –Citoqueratina 19

CLIS – Carcinoma Lobular in Situ

DNA – Ácido desoxirribonucleico, do inglês Desoxyribonucleic Acid

GLOBOCAN – Global Cancer Observatory: CANCER TODAY

HER2 – Human Epidermal Growth Factor

IBCSG – International Breast Cancer Study Group

IMC – Índice de Massa Corporal

ITC – Células Tumorais Isoladas

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro, do inglês Messenger Ribonucleic Acid

NCCN –National Comprehensive Cancer Network

NST – Not Special Type

OMS – Organização Mundial da Saúde

OSNA[®] – One Step Nucleic Acid Amplification

qRT-PCR – Quantitative Reverse Transcriptase–Polymerase Chain Reaction

RE – Recetor de Estrogénio

RP – Recetor de Progesterona

RT-LAMP – Reverse Transcription Loop–Mediated Isothermal Amplification

SAP – Serviço de Anatomia Patológica

SCN – Sistema de Classificação de Nottingham

SPSS – Statistical PaCKage for the Social Scienses

TC – Tomografia Computorizada

TNM – Tumor, Nódulo, Metástases

UICC – The Union for International Cancer Control

Índice de Figuras

Figura 1. Taxas de Incidência e Mortalidade do cancro da mama. Dados de 2020 a nível mundial. Adaptado de (1).....	1
Figura 2. Números de novos diagnósticos de cancros, em 2020, a nível mundial (A) e em Portugal (B). Adaptado de (1).....	1
Figura 3. Estadiamento do cancro da mama baseado no sistema TNM. Adaptado de (40).....	6
Figura 4. Distribuição do número de casos por escalão etário.....	16
Figura 5. Distribuição dos resultados do ensaio OSNA® pelo resultado do imprint.....	20
Figura 6. Resultado definitivo após análise em cortes de parafina dos gânglios resultantes do esvaziamento axilar.....	21

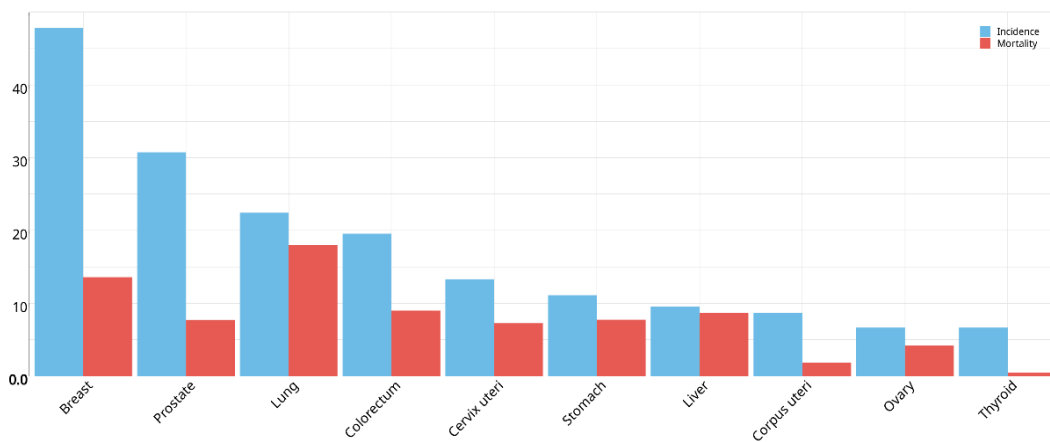
Índice de Tabelas

Tabela 1. Sistema de Classificação de Nottingham: características e respetivos scores.....	4
Tabela 2. Classificação molecular do cancro da mama. Adaptado de (4, 39, 46).....	7
Tabela 3. Categorização dos resultados de acordo com o número de cópias de CK19 obtida no RD100i/RD-210 (Adaptado do Guia de formação OSNA® da Sysmex Corporation®) (72).....	15
Tabela 4. Distribuição das frequências absolutas e relativas do número de casos por ano.....	16
Tabela 5. Follow up e avaliação da metastização.....	17
Tabela 6. Frequências absolutas e relativas dos casos categorizados em cada um dos parâmetros utilizados para caracterização dos tumores.....	18
Tabela 7. Caracterização do número de gânglios enviados para exame extemporâneo.....	19
Tabela 8. Frequências absolutas de parâmetros avaliados na caracterização do exame extemporâneo e sua associação com os resultados do ensaio OSNA®.....	19
Tabela 9. Frequências absolutas de parâmetros avaliados e sua associação com os resultados do ensaio OSNA®.....	22

1. Introdução

1.1. O Cancro da Mama

O cancro da mama tem uma incidência estimada de 47,8 casos por cada 100 mil habitantes, a nível mundial (Figura 1) e foram registados 2,2 milhões de novos casos diagnosticados (Figura 2), tornando-o no tumor maligno mais incidente do mundo, em 2020, segundo dados da GLOBOCAN. Este tipo de cancro corresponde ao tumor maligno com a segunda maior taxa de mortalidade mundial, estimada em 13,6 casos por cada 100 mil habitantes (Figura 1). Em Portugal, esta neoplasia apresenta incidência estimada de 70,8 casos por cada 100 mil habitantes, com 7041 novos casos



diagnosticados (Figura 2) e uma taxa de mortalidade de 12,7 casos por cada 100 mil habitantes, em 2020 (1).

Figura 1. Taxas de Incidência e Mortalidade do cancro da mama. Dados de 2020 a nível mundial. Adaptado de (1).

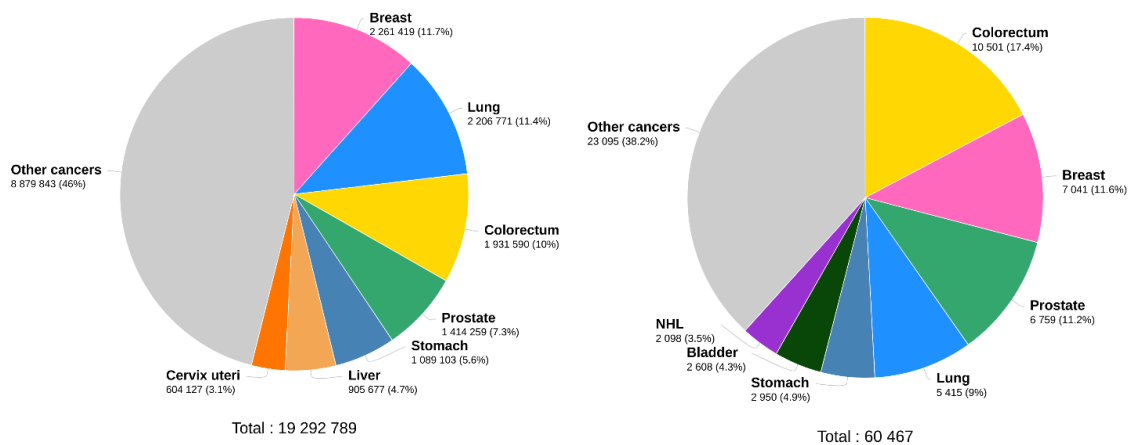


Figura 2. Números de novos diagnósticos de cancros, em 2020, a nível mundial (A) e em Portugal (B). Adaptado de (1).

O cancro da mama é uma doença multifatorial, sendo conhecidos vários fatores que contribuem para o seu desenvolvimento, tais como ser do género feminino, a idade, a história reprodutiva da mulher, consumo de álcool, terapêutica hormonal de substituição, condições benignas da mama e predisposição genética. Vários fatores podem estar associados ao cancro da mama, não estando apenas por um fator de risco envolvido (2 - 4).

Relativamente ao género, a maior percentagem de cancro da mama ocorre no sexo feminino e apenas aproximadamente 1% ocorre no sexo masculino (4). A doença surge em qualquer idade após a puberdade, com taxas crescentes na vida adulta, assistindo-se a um aumento do risco ao seu desenvolvimento associado ao envelhecimento (3 - 6).

A história reprodutiva também é um fator preponderante que influencia o desenvolvimento de cancro da mama, estando descrito que quanto mais cedo a mulher menstruar e quanto mais tarde entrar na menopausa, maior é o risco de desenvolver cancro da mama (4, 7). Cada atraso de um ano na menopausa aumenta o risco de cancro da mama em 3% (7). Vários estudos demonstraram que a utilização da terapia hormonal na menopausa está associada a um aumento do risco de desenvolvimento de cancro da mama, embora o seu uso melhore significativamente a qualidade de vida por aliviar os sintomas da menopausa (7 - 12). A gravidez é um fator protetor, exceto se as mulheres tiverem o seu primeiro filho em idade avançada. Mulheres que não tiveram uma gravidez a termo têm um risco aumentado de cancro de mama. Cada atraso de um ano na menarca ou cada nascimento adicional diminui o risco de cancro de mama em 5% e 10%, respetivamente (4, 7 - 12).

O consumo de álcool pode levar a um aumento de níveis de estrogénio, tendo-se verificado em diversos estudos que a sua ingestão pode aumentar o risco de desenvolvimento de cancro da mama em cerca de 30% (4, 6, 8). Em indivíduos obesos, também está descrito um aumento dos níveis de estrogénio, o que leva a uma associação entre um maior índice de massa corporal (IMC) e o aumento do risco de desenvolver neoplasia. Assim, devem ser adotadas medidas de estilo de vida mais saudável, para redução do risco de desenvolvimento da doença (4, 6, 8, 13 -15).

Algumas condições benignas da mama podem aumentar risco de desenvolver cancro da mama, nomeadamente as lesões proliferativas com atipia, que foram já associadas a um risco aumentado, e as alterações proliferativas sem atipia, que estão apenas associadas a um risco ligeiramente aumentado (4, 7, 9, 16, 17).

A história familiar é um importante fator de risco para a incidência de cancro da mama (3, 4). As mulheres com cancro da mama na sua família de primeiro grau e/ou um parente de primeiro grau diagnosticado antes dos 50 anos em comparação com as diagnosticadas após os 50 anos têm maior probabilidade de vir a desenvolver a doença (3, 4, 18, 19). Quando uma mulher tem história familiar de cancro da mama deve realizar um estudo genético, pois cerca de 5% das neoplasias da mama são classificadas como hereditárias e cerca de 10% a 20% estão associadas a história

familiar (18 – 21). Os genes *breast cancer 1* (BRCA1) e *breast cancer 2* (BRCA2) são genes supressores tumorais que codificam proteínas que estão envolvidas nos mecanismos de reparação de erros no ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês Desoxyribonucleic Acid)). Mutações nos genes BRCA1 ou BRCA2 levam ao desenvolvimento do cancro da mama hereditário, são herdados de forma autossômica dominante, estando associados a um risco cumulativo médio de desenvolvimento de cancro da mama aos 80 anos de 72% (BRCA1) e 69% (BRCA2) (18 – 21). O risco relativo de desenvolvimento de neoplasia da mama em homens com mutação do gene BRCA1 é de 1% e dos que apresentam mutação no gene BRCA2 varia entre 6 e 8% (20, 21).

1.2. Classificação histológica

A designação corrente de cancro da mama refere-se a uma neoplasia maligna de origem epitelial da mama, o carcinoma mamário, que tem capacidade de disseminação e é caracterizado pela sua heterogeneidade clínica, morfológica e molecular (22).

Os carcinomas da mama são estratificados em vários subtipos através do exame anátomo-patológico, nomeadamente segundo o tipo histológico (classificação da Organização Mundial da Saúde [OMS]), o grau histopatológico (sistema de *Elston & Ellis*) e o sistema TNM (*American Joint Committee on Cancer [AJCC]/The Union for International Cancer Control [UICC]*). O estadio TNM que tem em consideração a terapia neoadjuvante pré-operatória, fornece um novo estadiamento TNM – terapia pós-neoadjuvante TNM (ypTNM) – para realizar o estadiamento de pacientes (22 - 28).

Os carcinomas mamários são divididos, por tipo histológico, em dois grandes grupos, o carcinoma *in situ* e o carcinoma invasor (22). O carcinoma *in situ* caracteriza-se pela proliferação de células neoplásicas nos ductos mamários, dando origem ao carcinoma ductal *in situ* (CDIS), ou nas unidades lobulares de ductos terminais, dando origem ao carcinoma lobular *in situ* (CLIS). Estes dois tipos de tumores são caracterizados por não invadir a membrana basal, não ocorrendo a disseminação, pelo que apresentam uma probabilidade de cura superior, não havendo necessidade de submeter os pacientes à quimioterapia. O carcinoma invasor tem diversos padrões histológicos e caracteriza-se pela invasão dos tecidos adjacentes aos ductos ou lóbulos mamários por células cancerígenas, e assim, tem um grande potencial de disseminação para outros órgãos. O carcinoma invasor de nenhum tipo especial (carcinoma invasor NST) é responsável por cerca de 50% a 75% dos casos de carcinoma mamário. O carcinoma lobular invasor representa entre 5% a 15% de todos os carcinomas mamários (22, 28 - 31).

No que concerne ao grau histológico de um tumor, o sistema de classificação de *Scarff-Bloom-Richardson* modificado por *Elston-Ellis*, conhecido como o Sistema de Classificação de

Nottingham (SCN) e recomendado por vários organismos profissionais a nível internacional (OMS, AJCC, *Royal* Colégio de Patologistas-UK), contempla a avaliação da diferenciação do carcinoma mamário (23,24,32). Este sistema utiliza um *score* obtido pela soma dos valores de três características histológicas: o pleomorfismo nuclear, a taxa mitótica e a formação tubular, onde é atribuída uma pontuação de 1 (próximo do normal) a 3 a cada uma das características (Tabela 1) (23, 24, 32 – 34).

Tabela 1. Sistema de Classificação de *Nottingham*: características e respetivos *scores*.

Característica	Score
Pleomorfismo nuclear	
Discreto	1
Moderado	2
Acentuado	3
Taxa mitótica	
Índice baixo	1
Índice moderado	2
Índice alto	3
Formação tubular	
Elevada	1
Moderada	2
Reduzida	3

O resultado do somatório do *score* atribuído a cada uma das três características permite agrupar os tumores em três graus: grau I (3 a 5), que corresponde a um tumor bem diferenciado; grau II (6 a 7), que corresponde a um tumor moderadamente diferenciado; e grau III (8 a 9), que corresponde a um tumor pouco diferenciado. Esta classificação tem valor preditivo terapêutico e um valor prognóstico, onde o carcinoma de grau I apresenta bom prognóstico e o carcinoma de grau III apresenta pior prognóstico (23, 24, 32 – 34).

O sistema TNM permite o estadiamento para caracterizar a extensão da doença, através da avaliação dos seguintes parâmetros: extensão do tumor primário (T); ausência ou presença de metástases em gânglios regionais (N); e a ausência ou presença de metástases à distância (M) (34 – 36).

O sistema TNM pode utilizar uma classificação pré-tratamento, uma classificação clínica (TNM ou cTNM), uma classificação histopatológica pós-cirurgia e uma classificação patológica (pTNM). A avaliação do tumor primário (T – score 1 a 4) baseia-se no tamanho e extensão do tumor, podendo esta ser estimada pela avaliação clínica (cT), que compreende exames físicos e imagiológicos (2, 24, 35, 37 – 39).

A avaliação patológica do tumor primário (pT) compreende o número, localização e o diâmetro dos tumores na peça cirúrgica, o tipo e o grau histológico, a avaliação das margens cirúrgicas (distância mínima e presença de CDIS), a avaliação de invasão vascular e a avaliação por imunohistoquímica da expressão de recetores hormonais. Após o tratamento neoadjuvante, é efetuada uma avaliação da resposta à quimioterapia e da doença residual (ypT), incluindo a presença de CDIS (2, 37- 39).

A avaliação de gânglios regionais (N – score 0 a 3) inclui a avaliação de gânglios axilares, supraclaviculares e da cadeia mamária interna ipsilateral. Os gânglios intramamários são considerados como axilares, para categorização deste parâmetro. A avaliação clínica (cN) dos gânglios, para além da palpação e da ecografia das áreas ganglionares regionais, deve compreender a realização da biopsia citológica ou histológica guiada por ecografia dos gânglios suspeitos. Posteriormente, a avaliação patológica (pN) pode ser realizada nos gânglios regionais através da avaliação do gânglio sentinela ou através dos gânglios excisados durante o esvaziamento axilar (aquando metastização do gânglio sentinela durante o exame extemporâneo). Pode ser acrescentada a avaliação da resposta à quimioterapia (ypN) e a presença de doença residual (2, 37- 39).

A avaliação de doença metastática (M – score 0 a 1) é realizada, em casos de tumores com um tamanho maior ou igual a 50mm, gânglios axilares clinicamente positivos, tumores biologicamente agressivos e alterações analíticas sugestivas de metastização. A doença metastática no carcinoma da mama envolve, mais frequentemente, o osso, fígado, pulmão, cérebro e gânglios linfáticos não regionais. Este diagnóstico compreende, por exemplo, uma tomografia computadorizada (TC) do tórax, uma ecografia ou ressonância magnética do abdómen, uma cintigrafia óssea ou uma tomografia por emissão de positrões com fluorodeoxiglucose (2, 37- 39).

O sistema TNM possibilita a caracterização de cinco estadios para o cancro da mama, designados por números romanos de 0 a IV (Figura 3). De uma forma geral, o prognóstico é melhor quanto menor é o estadio (24, 35, 40, 41).

Embora a classificação histológica se encontre bem estabelecida e validada, permanece insuficiente para refletir a heterogeneidade biológica e clínica do carcinoma mamário. O progresso de técnicas moleculares e da bioinformática ajuda a compreensão da biologia e do comportamento do tumor, dividindo em diferentes subtipos moleculares, contribuindo para auxiliar a atribuição de diferentes prognósticos e opções terapêuticas (42, 43).

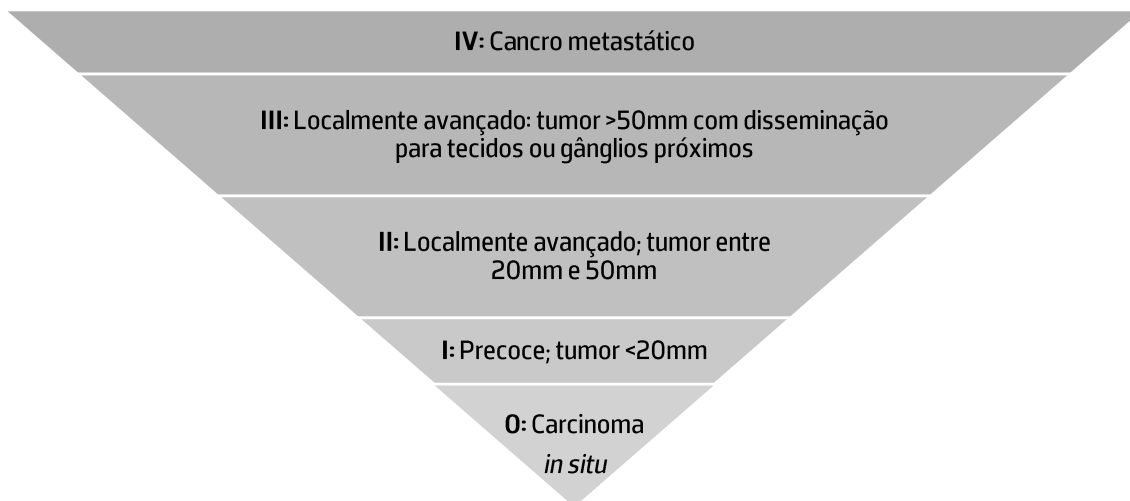


Figura 3. Estadiamento do cancro da mama baseado no sistema TNM. Adaptado de (40).

1.3. Classificação molecular

Os tumores mamários são classificados em quatro subtipos moleculares (Tabela 3), baseados, essencialmente, no estado de expressão do recetor de estrogénio (RE), do recetor de progesterona (RP) e do recetor do tipo 2 do *Human Epidermal Growth Factor* (HER2). Adicionalmente, é realizada a avaliação do índice de proliferação tumoral, através da avaliação da expressão do biomarcador nuclear KI67. Esta caracterização permite avaliar os tumores que respondem a terapias dirigidas, assim como prever o comportamento dos tumores, determinando o seu prognóstico (39, 44, 45).

A expressão de RE ocorre em cerca de 75% de todos os tumores mamários, sendo o carcinoma da mama RE positivo o tipo mais prevalente de carcinoma mamário diagnosticado em mulheres (4, 47,48). A expressão do RE, apesar de ter um valor preditivo negativo, tem uma boa relação com a eficácia da terapia endócrina, visto que, ao visar uma melhoria dos resultados clínicos, aumenta as taxas de tratamento do cancro precoce, melhora as taxas de resposta e permite um controlo da doença metastática (4, 39, 44, 45, 47, 48).

O recetor HER2 é um recetor membranar para fatores de crescimento, estando a sua expressão associada ao crescimento/proliferação celular. O HER2 está sobreexpresso em cerca de 12% a 20% dos carcinomas da mama, estando associado a características histológicas mais agressivas e a um pior prognóstico (42). Contudo, pacientes com tumores HER2⁺ têm uma boa resposta terapias dirigidas anti-HER2, tal como, o Trastuzumab, apresentando uma melhoria da sobrevida livre de progressão e ainda da sobrevida global, quando combinada com quimioterapia no cancro metastático (39, 42, 44, 45, 49, 50).

Tabela 2. Classificação molecular do cancro da mama. Adaptado de (4, 39, 46).

Parâmetro	Luminal A	Luminal B		Enriquecido com HER2	Tipo basal (Triplo negativo)
Recetor de Estrogénio e de Progesterona	Positivos	Um ou ambos positivos		Negativos ou positivos	Negativos
HER2	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
KI67	Baixo	Indiferente	Alto	Alto	Alto
Grau histológico	I ou II	II ou III		III	III
Resposta terapêutica	Terapia hormonal	Quimioterapia, Trastuzumab, terapia endócrina		Trastuzumab, quimioterapia	Quimioterapia
Prognóstico	Favorável	Desfavorável		Desfavorável	Muito desfavorável

A expressão do marcador de proliferação tumoral KI67 também deve ser determinada por imunohistoquímica (42). O índice KI67 é um relevante biomarcador porque permite avaliar a agressividade da doença. Uma expressão elevada de KI67 está associada a um maior grau histológico do tumor e, para além disso, é importante para a adaptação do esquema terapêutico, pois a resposta à quimioterapia pode ser alterada consoante a atividade proliferativa de células cancerígenas. Outros estudos relatam que, apesar de não existir consenso sobre *cutoff* ideal que determine o que é um valor baixo ou elevado, usado para auxiliar as decisões terapêuticas, o índice alto de KI67 está associado a uma maior taxa de recidiva e a uma pior sobrevida (39, 42, 44, 45, 51 - 55).

O estudo imunohistoquímico também é utilizado na pesquisa de células epiteliais tumorais, as quais expressam a citoqueratina 19 (CK19), na biopsia tumoral. Esta avaliação é imprescindível para identificar os pacientes que podem ser alvo de uma avaliação intraoperatória do gânglio sentinela através do ensaio *One Step Nucleic acid Amplification* (OSNA®), sendo assim, definido um critério de inclusão, casos positivos para a expressão da CK19, para a realização do ensaio OSNA® intraoperatório (56 - 57). Na biopsia do gânglio esta pesquisa é realizada para identificar macro e micro metástases de cancro da mama porque a expressão de CK19 é específica para células epiteliais de mama, não sendo expressa nas células presentes em gânglios linfáticos normais. (39, 56 - 59)

A utilização de assinaturas multigenes também se tornou mais usual por ter impacto prognóstico e informação preditiva relativamente à eficácia da hormonoterapia, da terapêutica alvo anti-HER2 e da quimioterapia neoadjuvante (39, 45).

1.4. Terapia mamária

O tratamento *standard* para o carcinoma mamário compreende a cirurgia combinada com outras terapias, como terapias dirigidas, radioterapia e/ou quimioterapia. O tipo de tratamento realizado é determinado por uma equipa multidisciplinar médica em conjunto com o paciente e, de acordo com diversos fatores, como o estadio da doença, as características do carcinoma e a idade da paciente. A escolha do tipo de cirurgia advém de fatores como a classificação histológica do tumor, podendo ser uma cirurgia conservadora da mama (tumorectomia, mastectomia segmentar ou parcial) ou mastectomia radical modificada (60, 61).

Nos carcinomas mamários em estadios iniciais (I ou II) realiza-se, numa primeira abordagem, a cirurgia conservadora da mama. No decorrer da cirurgia, o cirurgião pode efetuar, quando necessário, a disseção ganglionar ou o esvaziamento ganglionar axilar, de forma a verificar a existência ou ausência de invasão linfática. Geralmente, após este tipo de cirurgia a paciente realiza radioterapia (60, 61).

A mastectomia radical modificada é realizada, principalmente, nos carcinomas mamários em estadio avançado (III). Nesta cirurgia é realizada a remoção total da mama e o esvaziamento dos gânglios axilares (60, 61). A remoção de toda a cadeia ganglionar axilar está associada a uma morbilidade considerável acarretando diversos efeitos secundários, como dormência e linfedema no braço (60 – 62).

Está descrito na literatura um aumento do número de casos diagnosticados em fases iniciais e com gânglios excisados negativos, pelo que, no sentido de diminuir a morbilidade associada ao esvaziamento axilar, têm sido adotadas metodologias que permitam a avaliação intraoperatória do gânglio sentinela, com vista à preservação da cadeia ganglionar axilar sempre que possível (60 – 62).

1.5. Gânglio sentinela

O gânglio sentinela é definido como o primeiro gânglio de uma área ganglionar a receber a linfa dessa região (63). No contexto de um carcinoma mamário, as células cancerígenas do tumor, conjuntamente com a linfa, drenam para a região axilar regional, mais precisamente para o gânglio sentinela. A principal via de disseminação dos tumores epiteliais é a via linfática, embora possa ocorrer por via sanguínea, dependendo da localização do tumor. O estado dos gânglios axilares é um fator crucial para prognóstico do cancro da mama e é utilizado para orientar decisões terapêuticas locais, regionais e sistémicas (63– 66)

A identificação do gânglio sentinela para a realização do ensaio OSNA® é efetuada através da injeção de um radiofármaco (linfocintilografia) na área próximo à aréola, nos dias que precedem a cirurgia, o qual vai drenar para o gânglio linfático e, durante a cirurgia, este é detetado através de um detetor de radiação (64 – 66).

No carcinoma mamário a cadeia ganglionar axilar é acessível cirurgicamente, pelo que é possível estudar a metastização do gânglio sentinela através da sua resseção (lindadenectomia). De referir que, se o gânglio sentinela está isento de metástases, os restantes gânglios da cadeia também estão isentos (64 – 66).

Durante a cirurgia, para além da remoção da lesão tumoral, é realizada a remoção do gânglio sentinela, para avaliação intraoperatória. Esta avaliação pode ser realizada através da aplicação de técnicas convencionais, que são, a realização de um esfregaço citológico ou de um *imprint* e/ou realização de cortes de congelação, com posterior coloração de Hematoxilina & Eosina (H&E), que permite a visualização de ambos ao microscópio ótico (64 – 66). Atualmente, em algumas instituições é realizado o ensaio OSNA® nos pacientes em que foi previamente confirmada a expressão da CK19 na biopsia tumoral.

1.6. One Step Nucleic Acid Amplification

As técnicas de biologia molecular utilizadas para a avaliação intraoperatória da presença de metástases no gânglio sentinela efetuam a deteção e a quantificação da expressão específica de um dado ácido ribonucleico mensageiro (mRNA, do inglês Messenger Ribonucleic Acid) (59). Existem duas técnicas passíveis de usar: a metodologia *quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (qRT-PCR), que por incluir várias etapas (extração de mRNA, purificação e síntese de ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA, do inglês Complementary Deoxyribonucleic Acid) é mais demorada; e a metodologia *One Step Nucleic Acid Amplification* (OSNA®), que é mais rápida, por ter apenas uma etapa, devido a ser possível efetuar a amplificação de genes sem purificação de ARN nesta técnica. De referir que na técnica OSNA® a incubação de amostras é feita a uma temperatura constante com uma mistura de *primers* e DNA polimerase (59, 67 – 72).

O ensaio molecular OSNA® é utilizado durante o exame extemporâneo para a avaliação do gânglio sentinela e analisa todo o tecido linfático do gânglio. É um método de diagnóstico molecular automatizado que utiliza a tecnologia *reverse transcription loop-mediated isothermal amplification* (RT-LAMP) como método de amplificação de ácidos nucleicos para detetar a nível do mRNA o grau de expressão do gene que codifica a CK19. A quantidade de expressão do mRNA para a CK19 está

correlacionada com o tamanho dos focos metastáticos presentes no gânglio analisado e o sistema indica a extensão da carga tumoral metastática (69 -72).

Este método utiliza a transcriptase reversa para converter o mRNA em cDNA e a replicação é realizada através do RT-LAMP. Este é um procedimento isotérmico rápido, a reação ocorre em cerca de 16 minutos, sem necessitar de purificação do ARN. A avaliação da expressão da CK19 é conseguida através de 6 pares de *primers* específicos para a mesma sequência alvo de cDNA. O princípio da detecção é baseado na libertação de pirofosfatos que ao interagirem com magnésio, originam um precipitado de pirofosfato de magnésio, que é detetado/lido por turbidimetria, sendo usado diretamente o homogeneizado do gânglio. A avaliação do resultado é conseguida pela comparação do valor obtido da amostra com uma curva padrão que é realizada com os valores obtidos para três calibradores com diferentes concentrações conhecidas de mRNA para a CK19 (69 - 74).

A primeira etapa da técnica consiste na pesagem do gânglio, que deve estar entre 25-600mg, seguida da sua maceração e a sua preparação com o reagente de homogeneização, que estabiliza as moléculas de mRNA e protege-as do efeito inibidor de substâncias potencialmente presentes no tecido homogeneizado. Posteriormente, a amostra é introduzida no sistema automatizado de detecção em tempo real que garante resultados rápidos, precisos e padronizados. O tempo despendido para apresentação dos resultados depende do número de gânglios que estão a ser analisados, mas no total o teste demora cerca de 30 minutos (69, 71, 72).

Uma das limitações desta técnica é o procedimento da amostra usar o gânglio na sua totalidade, o que não permite a posterior reavaliação do material (57). Para além desta limitação por isso, alguns estudos revelam que este método pode dar resultados controversos em pacientes com terapia neoadjuvante, devido à quimioterapia pode alterar a expressão da CK19. Outras limitações são a impossibilidade de avaliar invasões extraganglionares associadas a um mau prognóstico e à obtenção de resultados falsos negativos devido à presença de metástases que têm uma baixa expressão de CK19, estando descrita em 1,6% a 11,1% dos casos, que é o caso dos carcinomas mamários com fenótipo triplo-negativo (75, 76).

A utilização do diagnóstico molecular, quando usada em exame intraoperatório, evita cirurgias secundárias causadas por falsos negativos, associados a exames intraoperatórios com base em cortes de congelação e em *imprints*, apresentando uma taxa média de falsos negativos dessas técnicas intraoperatórias de 25% (75, 77).

O OSNA[®] evita assim erros de amostragem porque utiliza todo o gânglio homogeneizado e demonstra eficácia para detecção de metástases em comparação com o método anatomopatológico convencional (66, 75). Esta técnica permite um aumento na detecção de micrometástases (grupos de células tumorais variando entre 0,2 e 2 mm) e células tumorais isoladas (ITC) não maior que 0,2

mm. Reconhece-se também a sua precisão e confiabilidade dado a diminuição de erros relacionados ao observador por ser um procedimento automatizado (36, 66, 72, 74, 75, 78).

1.7. Micrometástase e macrometástase

No cancro da mama a disseminação ocorre desde um estadio inicial e progride para lesão invasora, com capacidade de metastização. A presença de metástases, é um indicador de malignidade (79, 80).

A positividade do gânglio sentinela é distinguida em duas categorias pelo OSNA®: micrometástase e macrometástase, sendo indicado proceder ao esvaziamento ganglionar axilar quando o gânglio linfático apresenta uma macrometástase (65, 72). Este procedimento pode causar morbilidades, visto que aquando da disseção ganglionar ou esvaziamento axilar podem ocorrer danos no plexo nervoso, o que representa uma preocupação quando é possível evitar. Quando é realizada apenas a disseção do gânglio sentinela existe menor probabilidade de ocorrer danos no plexo nervoso e consequentemente um menor risco de ocorrer morbilidades. O resultado positivo para micrometástase leva, na maioria das vezes, a uma abordagem conservadora da axila (65, 81–86). Tem sido evidenciado uma diminuição significativa no número de esvaziamentos injustificáveis, em cerca de 61,4% a 83,3% dos pacientes submetidos a avaliação intraoperatória do gânglio sentinela, uma vez que está demonstrado que as ITC apresentam baixo risco de metastização axilar (85).

O estudo desenvolvido pelo *IBCSG Statistical Center* (IBCSG *Trial*23–01) demonstrou que, após um acompanhamento médio de 9,7 anos, a disseção ganglionar axilar não é fundamentada para pacientes com gânglio sentinela micrometastático, não sendo encontrada nenhuma diferença na sobrevida livre de doença, sobrevida global ou recorrência da doença (84, 88, 89). Outros estudos, evidenciam também que a disseção axilar não se justifica em pacientes com envolvimento limitado do gânglio sentinela, desde que os pacientes com cirurgia conservadora da mama recebam radioterapia e tratamento adjuvante sistémico (87–90).

A realização da abordagem conservadora da axila quando o resultado do OSNA® é de micrometástase pode ser ou não benéfica, dado que alguns estudos demonstram ser benéfica e outros estudos relatam que 20% a 30% dos pacientes com gânglios linfáticos negativos vão desenvolver doença metastática do mesmo tumor (62, 65, 86). A realização da remoção de todos os gânglios axilares nos casos em que o OSNA® tem o resultado de macrometástase, apesar de ser o procedimento recomendado pelas normas internacionalmente estabelecidas, acarreta morbilidades consideráveis para a paciente e poderão os gânglios removidos não estar metastizados o que por si não causaria disseminação da doença. Estudos relatam ainda que a disseção axilar não é necessária para controlar a doença a longo prazo e para a sobrevida da

paciente, mesmo para pacientes com tumores positivos para recetores hormonais de recorrência tardia (62, 65, 86, 91, 92). Além disso, em casos de cancro precoce, quase 80% das disseções axilares não apresentam metástases e, portanto, constituem uma cirurgia de remoção dos gânglios axilares desnecessária (83).

A metastização ganglionar é um elemento importante de prognóstico. A biopsia do gânglio sentinela permite realizar um estadiamento, mas não é suficiente para a tomada de decisões intraoperatórias e, por essa razão, são realizadas outras técnicas durante a cirurgia que permitem prever melhor o tumor, tais como, *imprint*, cortes de congelação e mais recentemente o OSNA® (66). A aplicação de técnicas apenas no gânglio sentinela permite aos patologistas uma maior concentração no pequeno número de gânglios removidos, que apresentam uma maior probabilidade de conter células tumorais, devido à sua característica de serem o primeiro filtro de drenagem da região. Após a avaliação da presença ou ausência de células neoplásicas e realizada a classificação do gânglio sentinela como positivo ou negativo, é feita uma gestão padronizada de acordo com diretrizes nacionais e internacionais, que orientam disseção ganglionar axilar em casos de positividade (66, 93, 94).

Até ao presente, continuam em debate as implicações prognósticas e terapêuticas da micrometástase em termos de recorrência local e de sobrevivência a longo prazo (66). Alguns estudos relatam que a deteção de micrometástases não afeta o prognóstico, mas outros autores descrevem que essa deteção representa um fator prognóstico negativo associado ao aumento do risco de comprometimento dos restantes gânglios não sentinela e do aparecimento de metástases à distância (95 – 97). Outros estudos referem que as características do tumor têm um papel importante na metastização, nomeadamente o seu tamanho, o comportamento biológico, a presença de invasão linfovascular e o grau histológico (98).

Uma técnica de deteção de metástases é crucial para a deteção e distinção entre gânglios sentinela negativos, com ITC, com micrometástases ou macrometástases, tendo em consideração que o tratamento do tecido linfático loco-regional desempenha um papel essencial (66, 94, 99).

A metastização ganglionar axilar é destacada como o fator de prognóstico isolado mais importante em pacientes com cancro da mama, mas a metastização ganglionar característica de cada tipo celular de cancro da mama não está ainda esclarecida. Continuam a decorrer diversos estudos no sentido de compreender melhor o comportamento dos tumores e a relação entre estes e a presença de metástases ganglionares (94, 99).

2. Objetivos

O estado do gânglio axilar é um indicador chave no prognóstico do cancro da mama. O método comumente utilizado para estudar o gânglio sentinela durante o exame extemporâneo é o *imprint*. Em algumas Instituições é utilizado o ensaio OSNA[®] que contribuiu para o aumento da sensibilidade na pesquisa de metástases no gânglio sentinela. Este ensaio quantifica o número de cópias do mRNA da citoqueratina 19 de forma a indicar metástases no gânglio sentinela.

Vários estudos investigam o impacto que o estado do gânglio sentinela pode ter no prognóstico do paciente, assim como na sua qualidade de vida.

O principal objetivo deste trabalho foi conhecer a realidade dos casos em que se realizou OSNA[®] na Unidade Local de Saúde de Matosinhos, EPE - Hospital Pedro Hispano, analisar e interpretar os dados para implementar melhorias nos procedimentos.

Para tal, procedeu-se a uma avaliação retrospectiva dos casos em que foi realizada a técnica do OSNA[®] e a uma comparação dos seus resultados com os obtidos em técnicas convencionais de avaliação de gânglios sentinela e gânglios não sentinela. Nos casos selecionados foram avaliadas possíveis associações entre os resultados obtidos pela técnica OSNA[®] (presença de micrometástases ou presença de macrometástases ganglionares) e parâmetros clinicopatológicos.

3. Materiais e Métodos

3.1. Amostra

Neste estudo foram recolhidas informações de pacientes com cancro da mama acompanhadas no Serviço de Anatomia Patológica (SAP), na Unidade Local de Saúde de Matosinhos, EPE – Hospital Pedro Hispano, entre os anos de 2015 e 2021. Foram incluídos no estudo pacientes do sexo feminino com resultado positivo para metastização ganglionar na avaliação intraoperatória do gânglio sentinela através do ensaio OSNA® e cuja expressão da CK19 foi confirmada previamente por imunohistoquímica em biopsia tumoral mamária.

As informações clinicopatológicas foram recolhidas das bases de dados do SAP. Foi identificado o ano de realização do OSNA® e a idade da paciente aquando o diagnóstico. Foram recolhidas informações sobre os antecedentes familiares de cancro da mama ou ovário e, nas pacientes que realizaram avaliação do estado mutacional do BRCA1 e BRCA2, foi recolhido o resultado obtido. Nas pacientes com presença de metástases de carcinoma da mama foi registado o ano em que foram diagnosticadas e a localização da metástase e, da mesma forma, foi recolhida a data em que foram registados casos de recidiva de carcinoma da mama. O tipo de terapia realizado pelas pacientes também foi considerado. Relativamente às características tumorais, os dados recolhidos foram o diagnóstico (segundo a O.M.S.), o grau histológico, o tamanho do tumor, a expressão dos recetores hormonais, HER2 e KI67 e a classificação molecular. No que concerne à avaliação dos exames extemporâneos, recolheu-se o resultado do OSNA® (micrometástase ou macrometástase), o número de gânglios enviados para OSNA®, o tamanho do maior gânglio enviado para OSNA® e o resultado do *imprint*. Foram consideradas as informações acerca da realização ou não de esvaziamento axilar, do número de gânglios enviados para análise em parafina resultantes do esvaziamento axilar e o respetivo resultado da análise histológica.

Para o tratamento dos dados, alguns parâmetros foram agrupados, nomeadamente a idade, o tamanho do tumor, tamanho do gânglio e a expressão do KI67. No caso da idade das pacientes aquando do diagnóstico foram definidos três grupos, ou seja, pacientes com idades menores de 30 anos, compreendidas entre os 30 e 50 anos, e maiores de 50 anos. Na avaliação do tamanho do tumor e do gânglio foram definidas duas categorias, tendo sido utilizado o valor mediano como ponto de corte. Na avaliação da expressão do KI67 os casos foram distribuídos em dois grupos amostrais consoante a percentagem de células que expressam do marcador KI67, nomeadamente no grupo “inferior a 30%” ou no grupo “igual ou superior a 30%”.

3.2. Realização do exame extemporâneo e OSNA®

O exame extemporâneo é realizado durante a cirurgia mamária e envolve a remoção e análise do gânglio sentinela, podendo ser excisados mais do que um gânglio axilar linfático. Os gânglios a analisar foram transportados sem fixador até ao SAP, tendo sido, na maioria das vezes, realizados *imprints*, além do OSNA®, que foram corados pela coloração de Hematoxilina-Eosina e avaliados microscopicamente. No ensaio OSNA®, o tecido adiposo foi separado do gânglio, sendo este pesado, homogeneizado e colocado no Analisador RD-100i ou no Analisador RD-210 (*Sysmex Corporation*®, Kobe, Japão). Este equipamento realiza a análise através da metodologia RT-LAMP, indicando o número de cópias de mRNA de CK19 com base numa curva de calibração e classificando o resultado em três categorias diferentes (Tabela 3).

Tabela 3. Categorização dos resultados de acordo com o número de cópias de CK19 obtida no RD100i/RD-210 (Adaptado do Guia de formação OSNA® da *Sysmex Corporation*®) (72).

CK19 Q.	CK19 SQ.	CK19 C. (cCp/ μ L)	Classificação da Metástase Ganglionar
Positivo	(++)	$\geq 5.0E+03$	Macrometástase
Positivo	(+)	$2.5E+02 - 5.0E+03$	Micrometástase
Negativo	(-)	$< 2.5E+02$	Negativo

Q.: Qualitativo; SQ.: Sinal-qualitativo; C: Carga tumoral cCp: Cópias

Nos exames extemporâneos em que foram recebidos mais do que um gânglio para a realização do OSNA®, o resultado determinado foi definido pelo gânglio que apresentou maior número de cópias de mRNA de CK19.

Nos casos em que foi realizado o esvaziamento axilar, os gânglios foram submetidos ao procedimento convencional histológico e foi feita a análise em cortes de parafina corados pela coloração de rotina Hematoxilina-Eosina, para avaliação da presença de células tumorais.

3.3. Análise estatística

Os resultados foram expressos sob a forma de frequências absolutas e relativas. Os dados foram tratados estatisticamente no software IBM *Statistical PaCKage for the Social Scienses* (SPSS) para o Windows® versão 28.0 (SPSS Inc, Illinois, Chicago). Os resultados foram estimados usando o intervalo de confiança de 95% e o nível de significância admitido foi de 0,05.

Foram verificadas as possíveis associações entre os resultados do ensaio OSNA®, micrometástase e macrometástase, e todos os parâmetros recolhidos relativamente à amostra em estudo, descritos anteriormente. A avaliação da associação entre as variáveis categóricas foi estudada através da aplicação do teste de Qui-quadrado, enquanto a associação com as variáveis numéricas baseou-se no teste T para amostras independentes.

4. Resultados

4.1. Caracterização da amostra

Neste estudo foram selecionados 79 casos de pacientes do género feminino que preencheram os critérios de inclusão definidos. A maior frequência de casos foi observada nos anos de 2019 e 2021, com 19 casos em cada ano (Tabela 4).

Tabela 4. Distribuição das frequências absolutas e relativas do número de casos por ano.

Ano de realização do OSNA®	Número de casos (%)
2015	5 (6%)
2016	0 (0%)
2017	17 (22%)
2018	15 (19%)
2019	19 (24%)
2020	4 (5%)
2021	19 (24%)
Total	79 (100%)

A idade média das pacientes selecionadas foi de 58 anos, com valor mediano de 57 anos, valor mínimo de 28 anos e valor máximo de 84 anos. O escalão etário a partir dos 50 anos foi o que apresentou maior frequência de casos, tendo apenas uma paciente apresentado idade inferior a 30 anos (Figura 4).

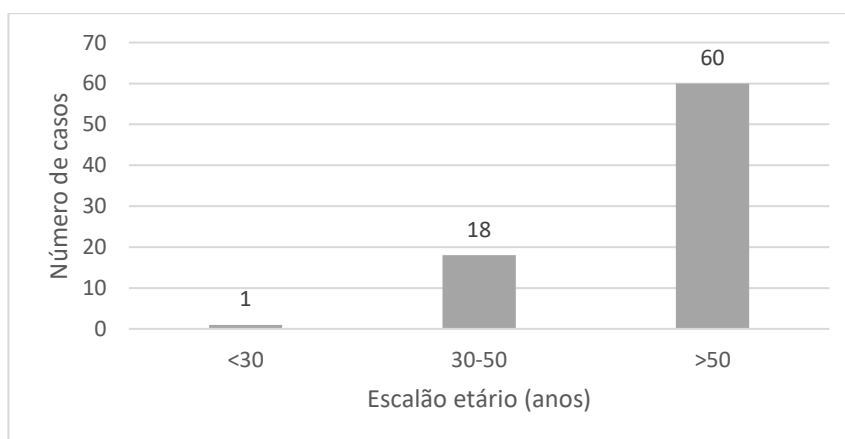


Figura 4. Distribuição do número de casos por escalão etário.

Dos casos estudados, 30 pacientes (38,0%) apresentaram antecedentes familiares de cancro da mama, não tendo sido possível recolher dados relativos aos antecedentes familiares de quatro pacientes (5,1%). Das 30 pacientes, 11 (36,7%) realizaram testes genéticos para pesquisa de

mutações no gene BRCA1 e BRCA2, sendo que uma (9,1%) apresentou resultado positivo para uma variante de significado incerto do gene BRCA2 (Ser1205del) e as restantes não apresentaram mutações para ambos os genes. Dos 45 casos (57,0%) que não apresentaram antecedentes familiares, quatro pacientes (8,9%) realizaram o teste genético, identificando-se apenas um caso com o resultado positivo para uma variante de significado clínico desconhecido relativamente ao gene BRCA2.

Da amostra em estudo, três pacientes (3,8%) foram diagnosticadas com metástases mamárias noutros órgãos (Tabela 5), diagnóstico esse realizado posteriormente à avaliação do gânglio sentinela pelo ensaio de OSNA®.

Tabela 5. *Follow up* avaliação da metastização.

Ano de realização do OSNA®	Ano de diagnóstico de metástase mamária	Localização da metástase mamária
2015	2020	Fígado
2017	2019	Osso
2017	2021	Osso

Foi também observado que três pacientes (3,8%) apresentaram recidiva local da doença, sendo que, nenhuma destas pacientes tinha sido submetida à avaliação intraoperatória pelo ensaio OSNA® na cirurgia anterior. As primeiras cirurgias ocorreram em 2008, 2016 e 2018, tendo sido diagnosticada a recidiva em 2019 (as duas primeiras) e em 2020, altura em que se realizou cirurgia com avaliação intraoperatória. Antes da cirurgia 29 das pacientes (36,7%) realizaram quimioterapia neoadjuvante.

4.2. Caracterização dos tumores

Na Tabela 6 encontra-se a caracterização dos tumores dos casos estudados, pela avaliação de cortes em parafina da biópsia mamária. O tumor mais prevalente é o carcinoma invasor NST (83,5%) e o menos prevalente é o carcinoma ductal in situ (1,3%). É de realçar que, relativamente ao índice KI67, mais de metade (64,9%) dos tumores do estudo apresentaram uma percentagem baixa de células marcadas (<30%). O subtipo luminal A destacou-se como sendo o subtipo molecular mais frequente na amostra (80,5%).

Tabela 6. Frequências absolutas e relativas dos casos categorizados em cada um dos parâmetros utilizados para caracterização dos tumores.

Parâmetro	Categoria	Número de casos (%)	Número total de casos analisados
Classificação histológica (O.M.S.)	Carcinoma ductal <i>in situ</i>	1 (1,3%)	79
	Carcinoma invasor NST	66 (83,5%)	
	Carcinoma lobular invasor	10 (12,7%)	
	Carcinoma papilar	2 (2,5%)	
Grau histológico	I	9 (12,3%)	73
	II	47 (64,4%)	
	III	17 (23,3%)	
Tamanho do tumor (mm)	≤18	41 (54,7%)	75
	>18	34 (45,3%)	
Expressão do Recetor de estrogénio	Positivo	73 (94,8%)	77
	Negativo	4 (5,2%)	
Expressão do Recetor de progesterona	Positivo	55 (71,4%)	77
	Negativo	22 (28,6%)	
Amplificação do HER2	Positivo	14 (18,4%)	76
	Negativo	62 (81,6%)	
Porcentagem de células marcadas para KI67	<30%	50 (64,9%)	77
	≥30%	27 (35,1%)	
Classificação molecular	Luminal A	62 (80,5%)	77
	Luminal B	11 (14,3%)	
	Enriquecido com HER2	1 (1,3%)	
	Tipo basal (Triplo negativo)	3 (3,9%)	

4.3. Caracterização do exame extemporâneo

No que diz respeito ao resultado do OSNA[®], da totalidade dos 79 casos, 37 (46,8%) foram considerados micrometástases, enquanto 42 (53,2%) corresponderam a macrometástases.

O número de gânglios enviados para o exame extemporâneo (Tabela 7) variou entre 1 e 7, tendo-se registado 30 casos (38,0%) com envio de apenas um gânglio. O tamanho médio do gânglio ou do maior gânglio enviado para OSNA[®] foi de 16,49mm (mediana=15,00mm; mínimo=3mm; máximo=35mm). No momento da cirurgia foi observado que mais de metade das pacientes (58,6%) apresentaram o maior gânglio enviado para extemporâneo com um tamanho menor ou igual a 15mm. Em relação ao tamanho do maior gânglio enviado para OSNA[®] não se verificou uma associação deste com o resultado obtido no OSNA[®] (Tabela 8).

Tabela 7. Caracterização do número de gânglios enviados para exame extemporâneo.

Número de gânglios enviados	Número de casos (%)
1	30 (38,0%)
2	28 (35,4%)
3	9 (11,4%)
4	7 (8,9%)
5	2 (2,5%)
6	2 (2,5%)
7	1 (1,3%)
Total	79 (100%)

Tabela 8. Frequências absolutas de parâmetros avaliados na caracterização do exame extemporâneo e sua associação com os resultados do ensaio OSNA®.

Parâmetro	Categoria	Resultado do OSNA®		Resultado estatístico (valor de p)	Número total de casos analisados
		Micrometástase	Macrometástase		
Número de gânglios	1	15	15	0,521	79
	2	10	18		
	3	7	2		
	4	4	3		
	5	1	1		
	6	0	2		
	7	0	1		
Tamanho do maior gânglio enviado para OSNA® (mm)	<15	11	18	0,097	79
	≥15	26	24		
Resultado do <i>imprint</i>	Positivo	10	25	*0,013	75
	Negativo	25	15		
Realização de esvaziamento axilar	Sim	15	37	*<0,001	79
	Não	22	5		
Análise histológica dos gânglios em cortes de parafina	Positivo para células neoplásicas	3	14	0,214	52
	Negativo para células neoplásicas	12	23		

*Valor estatisticamente significativo
OSNA®: One Step Nucleic Acid Amplification

Durante o exame extemporâneo do gânglio sentinela, nos 75 casos (94,9%) em que foi realizado *imprint*, observaram-se 35 casos positivos (46,7%) e 40 negativos (53,3%) para presença de células malignas. Relativamente à distribuição dos resultados do OSNA® em casos de *imprint*

positivo ou negativo (Figura 5 e Tabela 8), observa-se que resultados negativos no *imprint* estão, na sua maioria, associados a casos de micrometástases, enquanto os resultados positivos no *imprint* estão associados a macrometástases, sendo as diferenças observadas estatisticamente significativas ($p=0,013$).

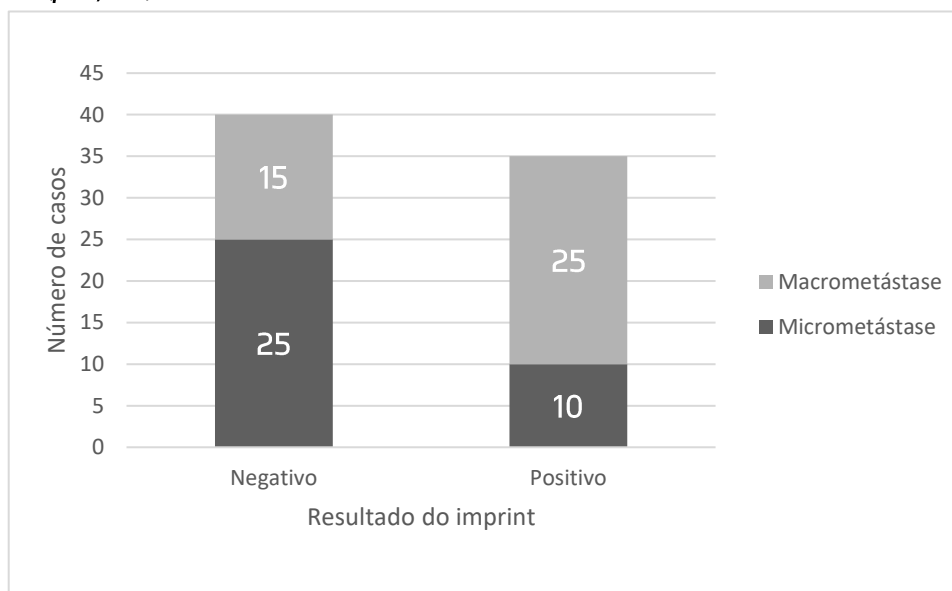


Figura 5. Distribuição dos resultados do ensaio OSNA® pelo resultado do *imprint*.

Relativamente ao procedimento do esvaziamento ganglionar da cadeia axilar, esta metodologia foi adotada em 52 dos casos (65,8%), onde 15 das pacientes (28,8%) que realizaram este procedimento apresentaram um resultado de micrometástase e 37 pacientes (71,2%) apresentaram macrometástase. De realçar que a maioria das doentes com macrometástase realizou o procedimento e, contrariamente a maioria das doentes com micrometástases não realizou o procedimento ($p<0,001$).

A média do número de gânglios retirados do esvaziamento axilar foi de 11,31, com o valor mediano de 11, valor mínimo de 1 gânglio retirado e valor máximo de 31 gânglios retirados. O número de gânglios removidos através do esvaziamento axilar e enviados para avaliação em parafina está correlacionado com o resultado de OSNA® ($p<0,001$), verificando-se que são enviados mais gânglios quando se detetam macrometástases.

Do total de casos de esvaziamento realizados, após avaliação histológica em parafina dos gânglios, 35 casos apresentaram resultado negativo para células neoplásicas (67,3%) e enquanto 17 apresentaram resultado positivo para células neoplásicas (32,7%) não se correlacionando esta avaliação com o resultado do OSNA® ($p=0,214$), observando-se que as macrometástases apresentam maior número de casos em ambos os resultados. Na Figura 6 encontra-se a relação do resultado do ensaio OSNA®, com o número de casos em que foi realizado esvaziamento axilar e a sua avaliação histológica definitiva em parafina.

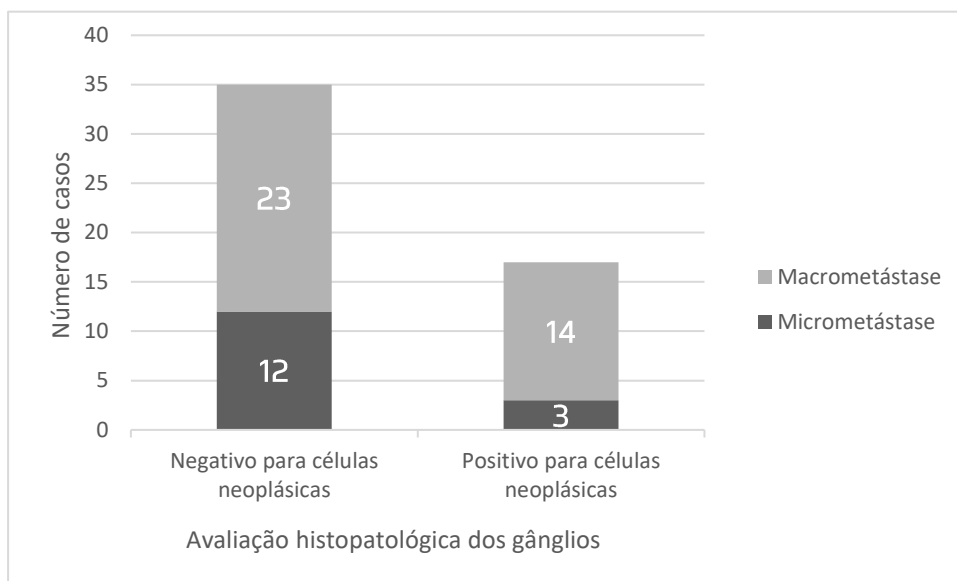


Figura 6. Resultado definitivo após análise em cortes de parafina dos gânglios resultantes do esvaziamento axilar.

4.4. Associação do resultado do ensaio OSNA® com os dados clinicopatológicos

A Tabela 9 sumariza a distribuição do número de casos de micrometástases e macrometástases pelos parâmetros avaliados, assim como o resultado da avaliação estatística relativa às potenciais associações.

Não foi verificada qualquer associação entre o resultado do ensaio OSNA® e os parâmetros avaliados, com a exceção da expressão do índice KI67.

Apesar de não ser estatisticamente significativo verificaram-se algumas tendências, que se passam a descrever. Foi observada a presença de um maior número de macrometástases nas pacientes com mais de 50 anos, sendo que, a maioria das doentes não tem antecedentes familiares de cancro da mama ou ovário. Relativamente às pacientes que apresentaram presença de metástases de carcinoma mamário, a paciente com metástase hepática tinha tido um resultado de micrometástase não tendo realizado esvaziamento axilar, enquanto as restantes duas realizaram este procedimento cirúrgico mais radical. Relativamente às duas últimas pacientes, uma obteve um resultado de micrometástase e outra de macrometástase, ambas com resultado positivo para células neoplásicas nos gânglios analisados em parafina. Na avaliação da recidiva de carcinoma da mama o ensaio OSNA® foi realizado após o diagnóstico de recidiva, sendo que a primeira paciente teve o resultado de micrometástase e as restantes pacientes de macrometástases. A paciente com micrometástase não realizou esvaziamento ganglionar, tendo sido realizado nas outras duas pacientes. Na análise definitiva dos gânglios em cortes de parafina foi observado um resultado positivo para células neoplásicas e um resultado negativo no outro caso.

Em relação à classificação molecular dos tumores existe um maior número de macrometástases no subtipo molecular luminal A.

A percentagem de células marcadas para KI67, quando comparada nos dois grupos com resultados diferentes no ensaio OSNA[®], é maioritariamente baixa nas macrometástases e alta nas micrometástases, tendo-se verificado diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos ($p=0,022$).

Tabela 9. Frequências absolutas de parâmetros avaliados e sua associação com os resultados do ensaio OSNA[®].

Parâmetro	Categoria	Resultado do OSNA [®]		Resultado estatístico (valor de p)	Número total de casos analisados
		Micrometástase	Macrometástase		
Idade da paciente na altura do diagnóstico	<30	1	0	0,439	79
	30-50	7	11		
	>50	29	31		
Antecedentes familiares de cancro da mama ou ovário	Sim	13	17	0,887	75
	Não	22	23		
Presença de metástases de carcinoma da mama	Sim	2	1	0,483	79
	Não	35	41		
Recidiva de carcinoma da mama	Sim	1	2	0,418	79
	Não	36	40		
Terapia para carcinoma da mama (Quimioterapia neoadjuvante)	Sim	14	15	0,845	79
	Não	24	26		
Diagnóstico (O.M.S.)	Carcinoma ductal <i>in situ</i>	1	0	0,722	79
	Carcinoma invasor NST	31	35		
	Carcinoma lobular invasor	4	6		
	Carcinoma papilar	1	1		
Grau histológico	I	6	3	0,262	73
	II	18	29		
	III	9	8		

Tabela 9. (Continuação) Frequências absolutas de parâmetros avaliados e sua associação com os resultados do ensaio OSNA®.

Parâmetro	Categoria	Resultado do OSNA®		Resultado estatístico (valor de p)	Número total de casos analisados
		Micrometástase	Macrometástase		
Tamanho do tumor (mm)	≤18	21	20	0,485	75
	>18	13	21		
Expressão do Recetor de estrogénio	Positivo	34	39	0,219	77
	Negativo	3	1		
Expressão do Recetor de progesterona	Positivo	26	29	0,396	77
	Negativo	11	11		
Amplificação do HER2	Positivo	7	7	0,741	60
	Negativo	22	24		
Porcentagem de células marcadas para KI67	<30%	19	31	*0,022	77
	≥30%	18	9		
Classificação molecular	Luminal A	28	34	0,792	77
	Luminal B	5	6		
	Enriquecido com HER2	1	0		
	Tipo basal (Tripló negativo)	2	1		

*Valor estatisticamente significativo
OSNA®: One Step Nucleic Acid Amplification

5. Discussão

Nesta instituição 100% dos casos de metastização ganglionar detetada através do ensaio OSNA® (n=79) ocorreram no sexo feminino, o que está de acordo com a literatura, uma vez que o maior número de casos de cancro da mama ocorre neste género (3 – 6).

O número de gânglios linfáticos sentinela metastizados diagnosticados pelo ensaio OSNA® sofreu um aumento do ano 2015 para o ano 2017, com uma ausência da realização da técnica no ano 2016, o que pode justificar o aumento de casos registado em 2017. No ano 2020 houve um decréscimo do número de casos detetados, podendo estar associado a um menor número de cirurgias realizadas em consequência da situação pandémica ou a um aumento dos casos negativos face aos outros anos, pelo que seria pertinente avaliar o número de cirurgias realizadas por ano, por forma a compreender esta diminuição dos casos positivos para metastização ganglionar.

Neste estudo, mulheres com menos de 50 anos apresentaram uma menor frequência de diagnóstico de cancro da mama, o que está de acordo com os dados da literatura, uma vez que o cancro da mama em mulheres jovens é menos incidente e afeta entre 4 a 6 % de mulheres com menos de 40 anos (100), pelo que, as mulheres com mais de 50 anos correspondem ao maior número de casos deste estudo, o que demonstra a eficiência do Programa de Rastreio de Cancro da Mama implementado, que é dirigido a mulheres assintomáticas com idade compreendida entre os 50 e os 69 anos (101). O rastreio poderá ser a origem de um maior número de casos nestas idades em comparação com outras faixas etárias. Uma revisão deste programa poderá ser útil no sentido de uma deteção do cancro da mama em grupos etários mais baixos e, consequentemente, num estadio mais precoce da doença.

De todos os casos, apenas duas pacientes (2,5%) apresentaram mutações no gene BRCA2. Da totalidade da amostra apenas em uma paciente (1,3%) com antecedentes se verificou a presença de mutação no gene BRCA2, o que está em consonância com outros estudos, pois é conhecido que uma mutação genética é identificada em <30% dos casos de pacientes com história pessoal e/ou familiar sugestiva de cancro da mama hereditário (21). De realçar que o número de pacientes com mutações neste gene poderá ser, na realidade maior, uma vez que o estado mutacional da grande maioria (81,0%) da amostra é desconhecido.

Durante a recolha dos dados deste estudo foram detetadas três pacientes com metastização noutros órgãos, sendo duas delas ósseas. O local mais comum de metastização para o cancro da mama é o osso e ocorre em cerca de 80% dos casos de cancro da mama (102). De duas pacientes com micrometástases, uma realizou esvaziamento ganglionar e a outra não, podendo assim depreender que a realização do esvaziamento não evitou a metastização. A paciente com macrometástase realizou esvaziamento ganglionar e o resultado da avaliação dos gânglios

enviados para análise histológica foi positivo para células neoplásicas, pelo que, nesta situação de presença de metástases ganglionares o procedimento de esvaziamento já não pôde prevenir a metastização. O número de casos de metastização é muito baixo e o percurso da doença não depende só do tipo de metástase ganglionar, por isso, seria necessário alargar a amostragem de forma a poder extrair conclusões mais fidedignas relativamente a este parâmetro.

Compreender melhor o padrão de recorrência e as taxas de sobrevivência de acordo com os subtipos do cancro da mama poderá ser vantajoso para a aplicação de um tratamento mais individualizado. As três pacientes que apresentaram recorrência da doença realizaram uma primeira cirurgia conservadora e nenhuma realizou o OSNA[®], pelo que, a realização desta técnica poderia apresentar vantagens nestes casos, uma vez que, se apresentassem uma macrometástase, confirmava-se um comportamento agressivo do tumor, com maior probabilidade de recidiva da doença.

A administração de quimioterapia neoadjuvante é uma estratégia pré-operatória comum para tumores localmente avançados, de forma a diminuir o tamanho do tumor antes da realização da cirurgia e não inviabiliza a realização do OSNA[®]. No entanto, de acordo com a literatura, a quimioterapia primária pode modificar os padrões de drenagem linfática na axila (103 – 106). Neste estudo, o número de macrometástases e micrometástases detetado em pacientes que realizaram ou não quimioterapia neoadjuvante é muito semelhante, sugerindo que a realização da terapia não beneficia os doentes no que diz respeito ao grau de metastização ganglionar axilar.

No que diz respeito à caracterização dos tumores, da amostra estudada o carcinoma invasor NST foi o tipo histológico mais frequente (83,5%), seguido do carcinoma lobular invasor (12,7%), resultados que estão em concordância com os estudos que apontam o carcinoma da mama invasor NST como o tipo mais comum de carcinoma invasor da mama (75 – 80%), seguido do carcinoma lobular invasor (31, 107).

O grau histológico do cancro da mama é um fator de prognóstico importante (108). Um estudo mostrou uma associação entre o grau histológico do tumor e a invasão de gânglios linfáticos, mas não conseguiram concluir sobre o tipo de relação existente entre estes parâmetros (109). No presente estudo também não foi possível aferir qualquer relação entre o grau histológico e presença de micrometástases ou macrometástases.

O tamanho do tumor foi anteriormente correlacionado com metástases ganglionares significativamente maiores (110). No presente estudo também se observou uma tendência semelhante, apesar de não validada estatisticamente, apresentando mais casos de micrometástases com tamanho do tumor ≤ 18 mm e mais casos de macrometástases com tamanho do tumor > 18 mm.

A avaliação imunohistoquímica por rotina do índice KI67 não é recomendada pela *American Society of Clinical Oncology* (ASCO) nem pela *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) porque não existem dados sobre efeitos das variáveis pré-analíticas da amostra. A NCCN também não expressa informações sobre o papel de prognóstico do KI67 no cancro da mama. Vários estudos relataram uma baixa reprodutibilidade, principalmente no subgrupo de tumores com atividade de proliferação intermediária, como entre 15% e 30%, havendo falta de consenso sobre a definição de baixa *versus* alta expressão e um ponto de corte apropriado (53, 110 – 112). Por essa razão, foi utilizado o valor de 30% como ponto de corte, definindo dois grupos, índice KI67 baixo (<30%) e alto (\geq 30%). Apesar de terem sido encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o valor deste índice e a presença de macro ou micrometástases, sabendo que os tumores com um maior índice KI67 geralmente apresentam um comportamento mais agressivo, não seria de esperar encontrar um índice baixo na maioria das macrometástases. Outro estudo que avaliou o índice KI67 em diferentes subtipos moleculares e histológicos encontrou um alto índice KI67 nos subtipos HER2⁺ e triplo negativo (112), que no presente estudo correspondiam a um pequeno número de casos, e ainda no carcinoma medular, que não estava representado na amostra deste estudo. O mesmo estudo não encontrou associação significativa do índice KI67 com metástases ganglionares (112). O presente estudo é maioritariamente representado pelo subtipo molecular Luminal A, sendo este associado a um índice KI67 menor (4, 39, 46), podendo contribuir para a explicação da presença de um índice <30% na maioria dos casos, quer micrometástases quer macrometástases. Relativamente a verificar-se uma tendência oposta àquela que seria de esperar, a explicação pode estar relacionada com o ponto de corte utilizado.

Segundo a literatura, mais de 50% dos casos de cancro da mama apresentam perfil molecular Luminal A, sendo o subtipo molecular mais prevalente, seguido do subtipo luminal B com uma prevalência média de 15%, o subtipo HER2⁺ com uma prevalência de 15%, e o subtipo triplo-negativo entre 10% a 20% (43, 114). Na amostra do estudo, o subtipo molecular mais comum observado também é o luminal A (80,5%), valores concordantes com o descrito na literatura. Em geral, o subtipo luminal A está associado a um prognóstico mais favorável, com uma sobrevida em 5 anos superior a 80% (114,115).

De acordo com outro estudo efetuado na mesma instituição entre o ano 2009 e 2011, em 10,1% dos casos, foram enviados mais de 5 gânglios, o que poderia estar relacionado com um grande número de pacientes poder ter mais do que um gânglio sentinela (116). No presente estudo, entre o ano 2015 e 2021, só foram enviados mais de 5 gânglios em 3,8% dos casos e mais de 3 gânglios em 15,2% dos casos. Dado que o OSNA[®] foi implementado na instituição para realizar a avaliação intraoperatória do gânglio sentinela e sabendo que esta técnica apresenta uma elevada sensibilidade e especificidade para a deteção da totalidade das metástases ganglionares, com

sensibilidade entre 91,7% a 97,7% e especificidade entre 93,4% e 99,3% (69, 71, 117, 118), pode ser colocada a hipótese de que os cirurgiões tenham mais confiança nos resultados, tendo reduzido o número de gânglios enviado para análise.

Na análise dos gânglios pela técnica de *imprint*, tendo em consideração que todos os casos apresentaram metastização ganglionar pelo OSNA[®], era presumível que não existissem diferenças estatisticamente significativas quando correlacionada com micrometástases e macrometástases. No entanto, mais de metade dos casos (53,3%) apresentou *imprint* negativo, o que demonstra uma baixa sensibilidade deste método para deteção de metástases comparativamente ao OSNA[®]. A maioria dos casos com *imprint* negativo (40 casos) correspondeu a casos de micrometástase (25 casos) e nos casos com *imprint* positivo (35 casos) a maioria correspondeu a casos de macrometástase (25 casos). O *imprint* consiste na compressão da área cortada do gânglio sentinela sobre uma lâmina de vidro (119) e, por isso, as macrometástases são mais fáceis de ser detetadas por esta técnica do que as micrometástases porque apresentam maiores dimensões, facto que aumenta a probabilidade da superfície de corte ter células neoplásicas e que sejam decalcadas estando presentes no *imprint*. Esta técnica tem vindo a ser substituída por apresentar limitações, sendo uma delas o baixo número de células para avaliação e uma baixa sensibilidade para deteção de micrometástases (87, 120, 121) o que também foi observada no presente estudo.

A pertinência do esvaziamento axilar é motivo de discussão quando o gânglio sentinela está metastizado e, por esse motivo, é fundamental diferenciar as pacientes com cancro da mama, de acordo com o tipo de metastização ganglionar que possuam: micrometástase ou macrometástase. De acordo com estudos anteriores, a probabilidade de haver gânglios não sentinela metastizados é inferior a 11% quando se está na presença de um tumor de tamanho igual ou inferior a 20 mm, unifocal e sem invasão vascular linfática, pelo que estes pacientes não devem ser submetidos ao esvaziamento axilar (122). Estimaram ainda que numa amostra de pacientes com o gânglio sentinela metastizado, cerca de 20% apresenta tumores com estas características (inferior a 20 mm, unifocal e sem invasão vascular linfática) e, por essa razão, uma em cada cinco pacientes com o gânglio sentinela metastizado não deve ser submetida ao esvaziamento axilar, dado que existe uma reduzida probabilidade de os restantes gânglios estarem metastizados (122). Um estudo randomizado, concluiu que o esvaziamento não oferece vantagem em pacientes com apenas micrometástases no gânglio sentinela, pois após um acompanhamento médio de cerca de 10 anos não verificaram diferenças entre as pacientes que realizaram o esvaziamento e as que não realizaram no que concerne à sobrevida livre de doença, o que reforça a não realização do esvaziamento em pacientes com envolvimento mínimo do gânglio sentinela (88, 89).

Das quinze pacientes com micrometástases que realizaram esvaziamento, doze não tiveram presença de células neoplásicas na avaliação em parafina dos gânglios excisados, pelo que

nestes casos não foi justificada a realização do esvaziamento ganglionar axilar. No presente estudo, quase todas as pacientes com macrometástase foram submetidas a esvaziamento axilar, embora se tenha verificado que a maioria das pacientes não apresentaram presença de células neoplásicas nos gânglios excisados e avaliados em parafina. O principal motivo para o resultado dos cortes em parafina não ser concordante com o resultado do OSNA[®] é que os gânglios utilizados para avaliação em parafina não são os mesmos que foram submetidos ao OSNA[®], mas sim os gânglios que se seguem na cadeia linfática e que são o resultado do esvaziamento axilar e, portanto, podem apresentar uma diferente representação de células neoplásicas. Outro motivo que pode explicar este resultado é que a avaliação dos gânglios em parafina não é representativa, tendo em conta que não são realizados cortes da totalidade do gânglio, podendo levar a resultados falso negativos.

O presente estudo apresenta algumas limitações, tais como: o tamanho da amostra ser pequeno (=79) e por isso ter interferido com a confiança da pesquisa na sensibilidade de detecção e identificação de diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos estudados; o ensaio OSNA[®] não estar implementado na instituição há tempo suficiente para permitir um acompanhamento das pacientes em termos de recorrência tumoral e sobrevida livre de doença.

O OSNA[®] é um método de detecção molecular com valores de corte estabelecidos para discriminar o gânglio negativo (menos de 250 cópias de mRNA de CK19/ μ L), de micrometástases (250–5000 cópias de mRNA de CK19/ μ L) ou macrometástases (mais de 5.000 cópias de mRNA de CK19/ μ L) (69). Um estudo mostrou que ao utilizar o ponto de corte tradicional do OSNA[®] muitas pacientes são submetidas a esvaziamento axilar sem os restantes gânglios não sentinela estarem positivos (123). Por isso, este estudo sugere novo corte para personalizar os tratamentos cirúrgicos e evitar procedimentos invasivos desnecessários. O valor de corte proposto foi de 9.150 cópias de mRNA de CK19 para utilizar em pacientes com tamanho tumoral <20 mm e com grau histológico mais baixo (G1) para evitar um tratamento cirúrgico axilar desnecessário (123).

6. Conclusão

O cancro da mama é uma doença muito prevalente que apresenta heterogeneidade clínica, morfológica e biológica. Esta complexidade dificulta a determinação e implementação de *guidelines* e condutas clínicas que são imprescindíveis para a aplicação de tratamentos apropriados. Consequentemente é relevante compreender e encontrar padrões que possam guiar decisões clínicas.

O ensaio OSNA[®] ao analisar o estado de metastização do gânglio sentinela permite o prognóstico intraoperatório, tendo um papel importante no auxílio da decisão para o tratamento cirúrgico axilar, podendo evitar uma segunda cirurgia para realizar o esvaziamento ganglionar axilar.

Com este estudo foi possível conhecer as características das pacientes acompanhadas na Unidade Local de Saúde de Matosinhos, EPE - Hospital Pedro Hispano por cancro da mama e confirmar que o OSNA[®] é uma metodologia mais segura na deteção de metástases ganglionares quando comparada à técnica convencional, principalmente para a deteção de micrometástases. No entanto, não se verificou nenhum padrão que determinasse um perfil característico do tipo de metastização do gânglio sentinela pelo OSNA[®].

Um estudo futuro randomizado controlado que integre todas as pacientes com cancro da mama que realizaram o ensaio molecular OSNA[®], com o intuito de aumentar a amostra e incluir os casos negativos para o OSNA[®] será importante para ser possível avaliar uma possível associação dos resultados do OSNA[®] com os obtidos com os do *imprint* e com os obtidos pela análise dos gânglios do esvaziamento em parafina. Um acompanhamento mais prolongado no tempo poderá ser vantajoso pois permitirá compreender melhor os perfis clínicos e anatomopatológicos dos tumores associando ao resultado do OSNA[®], poderão ser estudados mais casos de recidiva e metastização, por forma a garantir um resultado mais seguro e uma menor morbilidade para as pacientes.

7. Referências Bibliográficas

1. WHO. GLOBOCAN [Internet]. Estimated age-standardized incidence and mortality rates (World) in 2020, females, all ages. 2020 [cited 2022 Oct 12]. Available from: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-dual-bars-2?v=2020&mode=cancer&mode_population=regions&population=900&populations=900&key=asr&sex=2&cancer=20&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&g
2. Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rubio IT, et al. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice *Guidelines* for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* [Internet]. 2019;30(8):1194–220. Available from: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz173>
3. (WHO) World Health Organization. Breast Cancer [Internet]. 2020 [cited 2022 Oct 5]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>
4. Fernandes I, Cortes P. Manual de Oncologia SPO Abordagem e tratamento do cancro da mama. Sociedade Portuguesa de Oncologia. 2020. p. 82–3.
5. Breast cancer risk factors you cannot change [Internet]. [cited 2022 Oct 11]. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/risk-and-prevention/breast-cancer-risk-factors-you-cannot-change.html>
6. Centers for Disease Control and Prevention. Risk Factors [Internet]. 2022 [cited 2022 Oct 5]. Available from: https://www.cdc.gov/cancer/lung/basic_info/risk_factors.htm
7. Sun YS, Zhao Z, Yang ZN, Xu F, Lu HJ, Zhu ZY, et al. Risk factors and preventions of breast cancer. *Int J Biol Sci*. 2017;13(11):1387–97.
8. Washbrook E. Risk factors and epidemiology of breast cancer. *Women's Heal Med*. 2006;3(1):8–14.
9. Lifestyle related breast cancer risk factors [Internet]. [cited 2022 Oct 10]. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/risk-and-prevention/lifestyle-related-breast-cancer-risk-factors.html>
10. Group C, Cancer B. Type and timing of menopausal hormone therapy and breast cancer risk: individual participant meta-analysis of the worldwide epidemiological evidence. *Lancet* [Internet]. 2019;394(10204):1159–68. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)31709-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31709-X)
11. Byrne C, Ursin G, Martin CF, PeCK JD, Cole EB, Zeng D, et al. Mammographic Density Change With Estrogen and Progestin Therapy and Breast Cancer Risk. *J Natl Cancer Inst*. 2017;109(9):1–7.

12. Salagame U, Banks E, O'Connell DL, Egger S, Canfell K. Menopausal hormone therapy use and breast cancer risk by receptor subtypes: Results from the New South Wales cancer lifestyle and evaluation of risk (CLEAR) study. *PLoS One*. 2018;13(11):1–14.
13. Alcohol, tobacco and breast cancer–collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58 515 women with breast cancer and 95 067 women without the disease Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer*. *Br J Cancer* [Internet]. 2002;87:1234–45. Available from: www.bjcancer.com
14. Jung S, Wang M, Anderson K, Baglietto L, Bergkvist L, Bernstein L, et al. Alcohol consumption and breast cancer risk by estrogen receptor status: In a pooled analysis of 20 studies. *Int J Epidemiol*. 2016;45(3):916–28.
15. Key TJ, Appleby PN, Reeves GK, Roddam A, Dorgan JF, Longcope C, et al. Body mass index, serum sex hormones, and breast cancer risk in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst*. 2003;95(16):1218–26.
16. Sinn HP, Elsayaf Z, Helmchen B, Aulmann S. Early breast cancer precursor lesions: Lessons learned from molecular and clinical studies. *Breast Care*. 2010;5(4):218–26.
17. Dyrstad SW, Yan Y, Fowler AM, Colditz GA. Breast cancer risk associated with benign breast disease: systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*. 2015;149(3):569–75.
18. Saslow D, Boetes C, Burke W, Harms S, Leach MO, Lehman CD, et al. American cancer society *guidelines* for breast screening with MRI as an adjunct to mammography. *Obstet Gynecol Surv*. 2007;62(7):458–60.
19. Brewer HR, Jones ME, Schoemaker MJ, Ashworth A, Swerdlow AJ. Family history and risk of breast cancer: an analysis accounting for family structure. *Breast Cancer Res Treat*. 2017;165(1):193–200.
20. Paluch-Shimon S, Cardoso F, Sessa C, Balmana J, Cardoso MJ, Gilbert F, et al. Prevention and screening in BRCA mutation carriers and other breast/ovarian hereditary cancer syndromes: ESMO clinical practice *guidelines* for cancer prevention and screening. *Ann Oncol*. 2016;27(Supplement 5):v103–10.
21. Shiovitz S, Korde LA. Genetics of breast cancer: A topic in evolution. *Ann Oncol*. 2015;26(7):1291–9.
22. (WHO) World Health Organization. *Breast Tumours*. 5th ed. 2014. 82–109 p.
23. ELSTON CW, ELLIS IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991;19(5):403–10.
24. L.H. Sobin MKG and CW. *TNM. Classification of Malignant Tumours*. 7th ed. 2009. 181–193

- p.
25. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin.* 2017;67(2):93–9.
 26. Giuliano AE, Connolly JL, Edge SB, Mittendorf EA, Rugo HS, Solin LJ, et al. Breast Cancer–Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin.* 2017;67(4):290–303.
 27. Edge SB, Compton CC. The american joint committee on cancer: The 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol.* 2010;17(6):1471–4.
 28. Coleman WB. Breast Ductal Carcinoma in Situ: Precursor to Invasive Breast Cancer. *Am J Pathol* [Internet]. 2019;189(5):942–5. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2019.03.002>
 29. Corben AD. Pathology of Invasive Breast Disease. *Surg Clin North Am* [Internet]. 2013;93(2):363–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.suc.2013.01.003>
 30. McCart Reed AE, Kalinowski L, Simpson PT, Lakhani SR. Invasive lobular carcinoma of the breast: the increasing importance of this special subtype. *Breast Cancer Res.* 2021;23(1):1–16.
 31. Reed MEMC, Kutasovic JR, Lakhani SR, Simpson PT. Invasive lobular carcinoma of the breast: Morphology, biomarkers and ‘omics. *Breast Cancer Res.* 2015;17(1):1–11.
 32. Ellis IO, Carder P, Hales S, Lee AH, Pinder SE, Rakha E, et al. Pathology reporting of breast disease in surgical excision specimens incorporating the dataset for histological reporting of breast cancer. *R Coll Pathol.* 2016;6148(version 2):1–160.
 33. Tavassoli FA DP. World Health Organization Classification of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. IARC Press. 2003. p. 19–23.
 34. Dixon JM. ABC of Breast Disease. 3th ed. Blackwell Publishing Ltd; 2006.
 35. SL. EHM. Cancro da mama–Orientações para o doente oncológico. *Cancro Online.* p. 30–3.
 36. Greene FL, Page D, Morrow M, Balch C, Haller D, Fritz A FI. AJCC CANCER STAGING MANUAL. 6th ed. New York: Springer; 2002.
 37. Gradishar WJ, Anderson BO, Abraham J, Aft R, Agnese D, Allison KH, et al. Breast cancer, version 3.2020. *JNCCN J Natl Compr Cancer Netw.* 2020;18(4):452–78.
 38. National Institute for Health and care Excellence (NICE). Early and locally advanced breast cancer Early and locally advanced breast cancer overview overview. 2022;(July 2018). Available from: <http://pathways.nice.org.uk/pathways/early-and-locally-advanced-breast-cancer>
 39. Cardoso F, editor. 100 Perguntas chave no Cancro da Mama. 2th ed. Permanyer Portugal;

2017. Soc. Port. Oncol.
40. CUF. Cancro Da Mama [Internet]. [cited 2022 Oct 5]. Available from: <https://www.cuf.pt/saude-a-z/cancro-da-mama>
 41. LIGA. Estadiamento – Cancro da Mama [Internet]. Liga Portuguesa Contra o Cancro. 2022 [cited 2022 Oct 10]. Available from: <https://www.ligacontracancro.pt/cancro-da-mama-estadiamento/>
 42. Rakha EA, Green AR. Molecular classification of breast cancer: what the pathologist needs to know. *Pathology*. 2017;49(2):111–9.
 43. Li J, Chen Z, Su K, Zeng J. Clinicopathological classification and traditional prognostic indicators of breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(7):8500–5.
 44. Dias K, DvorKin-Gheva A, Hallett RM, Wu Y, Hassell J, Pond GR, et al. Claudin-low breast cancer; clinical & pathological characteristics. *PLoS One*. 2017;12(1):1–17.
 45. Network TCGA. Comprehensive molecular portraits of human breast tumors The Cancer Genome Atlas Network. *Nature*. 2012;490(7418):61–70.
 46. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ. Strategies for subtypes–dealing with the diversity of breast cancer: Highlights of the St Gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2011. *Ann Oncol*. 2011;22(8):1736–47.
 47. Effi AB, Aman NA, Kouï BS, Koffi KD, Traoré ZC, Kouyate M. Immunohistochemical determination of estrogen and progesterone receptors in breast cancer: Relationship with clinicopathologic factors in 302 patients in Ivory Coast. *BMC Cancer*. 2017;17(1).
 48. Lumachi F, Brunello A, Maruzzo M, Basso U, Basso S. Treatment of Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer. *Curr Med Chem*. 2013;20(5):596–604.
 49. Rakha EA, Pinder SE, Bartlett JMS, Ibrahim M, Starczynski J, Carder PJ, et al. Updated UK recommendations for HER2 assessment in breast cancer. *J Clin Pathol*. 2015;68(2):93–9.
 50. Ennis S Lamon DJ, Rian Eyland-j Ones BL, Teven Hak SS, Ank Uchs HF, Irginia Aton VP, Harm PD, et al. The New England Journal of Medicine USE OF CHEMOTHERAPY PLUS A MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST HER2 FOR METASTATIC BREAST CANCER THAT OVEREXPRESSES HER2 BaCKground The HER2 gene, which encodes the. *N Engl J Med* [Internet]. 2001;344(11):783–92. Available from: www.nejm.org
 51. Hashmi AA, Hashmi KA, Irfan M, Khan SM, Edhi MM, Ali JP, et al. KI67 index in intrinsic breast cancer subtypes and its association with prognostic parameters. *BMC Res Notes* [Internet]. 2019;12(1). Available from: <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4653-x>
 52. Alba E, Lluch A, Ribelles N, Anton-Torres A, Sanchez-Rovira P, Albanell J, et al. High Proliferation Predicts Pathological Complete Response to Neoadjuvant Chemotherapy in

- Early Breast Cancer. *Oncologist*. 2016;21(6):778–778.
53. Fitzgibbons PL, Connolly JL, CAP. Template for reporting results of biomarker testing of specimens from patients with carcinoma of the endometrium. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. 2022.
 54. De Azambuja E, Cardoso F, De Castro G, Colozza M, Mano MS, Durbecq V, et al. KI-67 as prognostic marker in early breast cancer: A meta-analysis of published studies involving 12 155 patients. *Br J Cancer*. 2007;96(10):1504–13.
 55. Trihia H, Murray S, Price K, Gelber RD, Golouh R, Goldhirsch A, et al. KI-67 expression in breast carcinoma: Its association with grading systems, clinical parameters, and other prognostic factors – A surrogate marker? *Cancer*. 2003;97(5):1321–31.
 56. De Almeida Salles M, Cúrcio VS, Perez AA, Gomes DS, Gobbi H. Contribuição da imunohistoquímica na avaliação de fatores prognósticos e preditivos do câncer de mama e no diagnóstico de lesões mamárias. *J Bras Patol e Med Lab*. 2009;45(3):213–22.
 57. Szychta P, Westfal B, Maciejczyk R, Smolarz B, Romanowicz H, Krawczyk T, et al. Intraoperative diagnosis of sentinel lymph node metastases in breast cancer treatment with one-step nucleic acid amplification assay (OSNA). *Arch Med Sci*. 2016;12(6):1239–46.
 58. Vodička J, Pesta M, Kulda V, Houfkova K, Vankova B, Sebek J, et al. Prognostic Significance of Lymph Node Examination by the OSNA Method in Lung Cancer Patients–Comparison with the Standard Histopathological Procedure. *Cells*. 2020;9(12):1–12.
 59. Horimoto Y, Tanabe M, Kazuno S, Miura Y, Mogushi K, Sonoue H, et al. Elucidation of inhibitory effects on metastatic sentinel lymph nodes of breast cancer during One-Step Nucleic Acid Amplification /631/67/1347 /631/67/322 /82/58 /38/77 article. *Sci Rep*. 2018;8(1):6–12.
 60. American Cancer Society. Breast Cancer: Treatment Guideline for Patients. *Nccn*. 2019;(September):6.
 61. LIGA. Métodos de Tratamento – Cancro da Mama [Internet]. Liga Portuguesa Contra o Cancro. 2022 [cited 2022 Oct 5]. Available from: <https://www.ligacontracancro.pt/cancro-da-mama-metodos-de-tratamento/>
 62. Giuliano AE, Ballman K V., McCall L, Beitsch PD, Brennan MB, Kelemen PR, et al. Effect of axillary dissection vs no axillary dissection on 10-year overall survival among women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis: The ACOSOG Z0011 (Alliance) randomized clinical trial. *JAMA – J Am Med Assoc*. 2017;318(10):918–26.
 63. IPO Lisboa. Biopsia Gânglio Sentinela [Internet]. 2022. Available from: https://www.ipolisboa.min-saude.pt/wp-content/uploads/2020/04/Cancro-Mama_Biopsia-Gânglio-Sentinela.pdf

64. Boughey JC, Suman VJ, Mittendorf EA, Ahrendt GM, Wilke LG, Taback B, et al. Sentinel lymph node surgery after neoadjuvant chemotherapy in patients with node-positive breast cancer: The ACOSOG Z1071 (alliance) clinical trial. *Jama*. 2013;310(14):1455–61.
65. Giammarile F, Vidal-Sicart S, Paez D, Pellet O, Enrique EL, Mikhail-Lette M, et al. Sentinel Lymph Node Methods in Breast Cancer. *Semin Nucl Med*. 2022;52(5):551–60.
66. Zanghì G, Di Stefano G, Caponnetto A, Vecchio R, Lanaia A, La Terra A, et al. Breast cancer and sentinel lymph node micrometastases: Indications for lymphadenectomy and literature review. *G di Chir*. 2014;35(11):260–5.
67. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res [Internet]*. 2000;28. Available from: https://watermark.silverchair.com/2800e63.pdf?token=AQECAHi208BE49Oan9kKhW_Ercy7Dm3ZL_9Cf3qfKAc485ysgAAAmYwggJiBqkqhKIG9w0BBwagggJTMIICTwIBADC CAkgGCSqGS1b3DQEHATAeBg1ghkgBZQMEAS4wEQQMy3AQPdcwVpshAVulAgEQgIICG SfU5ehJRqbly2A_4pd12_oNbrQem7FM_kTE9ZYQL40XC4I
68. Baker M, Gillanders WE, Mikhitarian K, Mitas M, Cole DJ. The molecular detection of micrometastatic breast cancer. *Am J Surg*. 2003;186(4):351–8.
69. Tsujimoto M, Nakabayashi K, Yoshidome K, Kaneko T, Iwase T, Aklyama F, et al. One-step nucleic acid amplification for intraoperative detection of lymph node metastasis in breast cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2007;13(16):4807–16.
70. Veys I, Majjaj S, Salgado R, Noterman D, Schobbens JC, Manouach F, et al. Evaluation of the histological size of the sentinel lymph node metastases using RT-PCR assay: A rapid tool to estimate the risk of non-sentinel lymph node invasion in patients with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;124(3):599–605.
71. Visser M, Jiwa M, Horstman A, Brink AATP, Pol RP, Van Diest P, et al. Intra-operative rapid diagnostic method based on CK19 mRNA expression for the detection of lymph node metastases in breast cancer. *Int J Cancer*. 2008;122(11):2562–7.
72. Sysmex Corporation. Guia de formação OSNA – Analisador RD-210. Versão 3.0; 2020.
73. Godey F, Leveque J, Tas P, Gandon G, Poree P, Mesbah H, et al. Sentinel lymph node analysis in breast cancer: Contribution of one-step nucleic acid amplification (OSNA). *Breast Cancer Res Treat*. 2012;131(2):509–16.
74. Sun X, Zhang Y, Wu S, Fu L, Yun JP, Wang YS. Intraoperative prediction of non-sentinel lymph node metastasis based on the molecular assay in breast cancer patients. *Cancer Manag Res*. 2019;11:9715–23.
75. Shigematsu H, OzaKI S, Yasui D, Zaitzu J, Taniyama D, Saitou A, et al. Comparison of CK-IHC

- assay on serial frozen sections, the OSNA assay, and in combination for intraoperative evaluation of SLN metastases in breast cancer. *Breast Cancer*. 2018;25(2):191–7.
76. Hammond MEH, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, et al. American society of clinical oncology/college of American pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). *Arch Pathol Lab Med*. 2010;134(7).
 77. Peg V, Espinosa-Bravo M, Vieites B, Vilardell F, Antúnez JR, De Salas MS, et al. Intraoperative molecular analysis of total tumor load in sentinel lymph node: A new predictor of axillary status in early breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;139(1):87–93.
 78. Hunter-Smith AE, Rayter Z. One-step nucleic acid amplification: The possible value in assessing sentinel lymph node metastasis during mastectomy. *Breast Cancer Targets Ther*. 2018;10:13–21.
 79. Carvalho M. Padrão de Metastização Das Células Tumorais da Mama. 2010.
 80. Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, Kerkvliet N, Morris VL, Chambers AF, et al. Multistep nature of metastatic inefficiency: Dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol*. 1998;153(3):865–73.
 81. Fung V, Kohlhardt S, Vergani P, Zardin GJ, Williams NR. Intraoperative prediction of the two axillary lymph node macrometastases threshold in patients with breast cancer using a one-step nucleic acid cytokeratin-19 amplification assay. *Mol Clin Oncol*. 2017;7(5):755–62.
 82. American Cancer Society. Breast-conserving Surgery (Lumpectomy) [Internet]. 2022 [cited 2022 Oct 5]. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/treatment/surgery-for-breast-cancer/breast-conserving-surgery-lumpectomy.html>
 83. American Cancer Society. Surgery for Breast Cancer [Internet]. 2022 [cited 2022 Oct 5]. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/treatment/surgery-for-breast-cancer.html>
 84. Galimberti V, Cole BF, Zurrada S, Viale G, Luini A, Veronesi P, et al. Axillary dissection versus no axillary dissection in patients with sentinel-node micrometastases (IBCSG 23-01): A phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Oncol* [Internet]. 2013;14(4):297–305. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70035-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70035-4)
 85. Wang Z, Wu LC, Chen JQ. Sentinel lymph node biopsy compared with axillary lymph node dissection in early breast cancer: A meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;129(3):675–89.
 86. Dionigi G, Castano P, Rovera F, Boni L, Annoni M, Villa F, et al. The application of sentinel lymph node mapping in colon cancer. *Surg Oncol*. 2007;16:129–32.

87. Magnoni F, Galimberti V, Corso G, Intra M, Sacchini V, Veronesi P. Axillary surgery in breast cancer: An updated historical perspective. *Semin Oncol* [Internet]. 2020;47(6):341–52. Available from: <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2020.09.001>
88. Miranda K, Pace Da, Cintron R, Rodrigues JCF, Fang J, Smith A, et al. IBCSG 23–01 randomised controlled trial comparing axillary dissection versus no axillary dissection in patients with sentinel node micrometastases. *Lancet Oncol*. 2011;76(6):1358–75.
89. Galimberti V, Cole BF, Viale G, Veronesi P, Vicini E, Intra M, et al. Axillary dissection versus no axillary dissection in patients with breast cancer and sentinel-node micrometastases (IBCSG 23–01): 10-year follow-up of a randomised, controlled phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2018;19(10):1385–93.
90. Solá M, Alberro JA, Fraile M, Santesteban P, Ramos M, Fabregas R, et al. Complete axillary lymph node dissection versus clinical follow-up in breast cancer patients with sentinel node micrometastasis: Final results from the multicenter clinical trial AATRM 048/13/2000. *Ann Surg Oncol*. 2013;20(1):120–7.
91. Abdul-Rasool S, Kldson SH, Panieri E, Dent D, Pillay K, Hanekom GS. An evaluation of molecular markers for improved detection of breast cancer metastases in sentinel nodes. *J Clin Pathol*. 2006;59(3):289–97.
92. Beek MA, Verheuel NC, Luiten EJT, Klompenhouwer EG, Rutten HJT, Roumen RMH, et al. Two decades of axillary management in breast cancer. *Br J Surg*. 2015;102(13):1658–64.
93. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer*. 1989;63(1):181–7.
94. Lyman GH, Giuliano AE, Somerfield MR, Benson AB, Bodurka DC, Burstein HJ, et al. American Society of Clinical Oncology guideline recommendations for sentinel lymph node biopsy in early-stage breast cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23(30):7703–20.
95. Tjan-Heijnen VCG, Bult P, De Widt-Levert LM, Ruers TJ, Beex LVAM. Micro-metastases in axillary lymph nodes: An increasing classification and treatment dilemma in breast cancer due to the introduction of the sentinel lymph node procedure. *Breast Cancer Res Treat*. 2001;70(2):81–8.
96. Rutledge H, Davis J, Chiu R, Cibull M, Brill Y, McGrath P, et al. Sentinel node micrometastasis in breast carcinoma may not be an indication for complete axillary dissection. *Mod Pathol*. 2005;18(6):762–8.
97. Houvenaeghel G, Nos C, Mignotte H, Classe JM, Giard S, Rouanet P, et al. Micrometastases in sentinel lymph node in a multicentric study: Predictive factors of nonsentinel lymph node involvement – Groupe des Chirurgiens de la Federation des Centres de Lutte Contre Le Cancer. *J Clin Oncol*. 2006;24(12):1814–22.

98. Viale G, Maiorano E, Mazzarol G, Zurrida S, Galimberti V, Luini A, et al. Histologic detection and clinical implications of micrometastases in axillary sentinel lymph nodes for patients with breast carcinoma. *Cancer*. 2001;92(6):1378–84.
99. Rydén L, Chebil G, Sjöström L, Pawlowski R, Jönsson PE. Determination of sentinel lymph node (SLN) status in primary breast cancer by prospective use of immunohistochemistry increases the rate of micrometastases and isolated tumour cells: Analysis of 174 patients after SLN biopsy. *Eur J Surg Oncol*. 2007;33(1):33–8.
100. Radecka B, Litwiniuk M. Breast cancer in young women. *Ginekol Pol*. 2016;87(9):659–63.
101. LIGA. Programa de Rastreio de Cancro da Mama [Internet]. 2022 [cited 2022 Oct 20].
102. Lutz S, Berk L, Chang E, Chow E, Hahn C, Hoskin P, et al. Palliative radiotherapy for bone metastases: An ASTRO evidence-based guideline. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2011;79(4):965–76.
103. Purushotham AD, Upponi S, Klevesath MB, Bobrow L, Millar K, Myles JP, et al. Morbidity after sentinel lymph node biopsy in primary breast cancer: Results from a randomized controlled trial. *J Clin Oncol*. 2005;23(19):4312–21.
104. Bleiweiss JJ. Sentinel lymph nodes in breast cancer after 10 years: rethinking basic principles. *Lancet Oncol*. 2006;7(8):686–92.
105. Benson JR. Sentinel lymph node biopsy and neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Pers Treat Breast Cancer*. 2016;10:49–62.
106. Kuehn T, Bauerfeind I, Fehm T, Fleige B, Hausschild M, Helms G, et al. Sentinel-lymph-node biopsy in patients with breast cancer before and after neoadjuvant chemotherapy (SENTINA): A prospective, multicentre cohort study. *Lancet Oncol* [Internet]. 2013;14(7):609–18. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70166-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70166-9)
107. Lyndin M, Hyriavenko N, Sikora V, Lyndina Y, Soroka Y, Romaniuk A. Invasive Breast Carcinoma of No Special Type with Medullary Pattern: Morphological and Immunohistochemical Features. *Turk Patoloji Derg*. 2022;38(3):205–12.
108. Rakha EA et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: The role of histological grade. *Breast Cancer Research* (2010) doi:10.1186/bcr2607. 2010.
109. Zodinpuii D, Pautu JL, Zothanlima B, Pachuau L, Kumar NS. Clinical features and first degree relative breast cancer, their correlation with histological tumor grade: a 5-year retrospective case study of breast cancer in Mizoram, India. *Environ Sci Pollut Res*. 2020;27(2):1991–2000.
110. Nielsen TO, Leung SCY, Rimm DL, Dodson A, Acs B, Badve S, et al. Assessment of KI67 in Breast Cancer: Updated Recommendations From the International KI67 in Breast Cancer Working Group. *J Natl Cancer Inst*. 2021;113(7):808–19.

111. Bustreo S, Osella–Abate S, Cassoni P, Donadio M, Airoidi M, Pedani F, et al. Optimal KI67 cut-off for luminal breast cancer prognostic evaluation: a large case series study with a long-term follow-up. *Breast Cancer Res Treat.* 2016;157(2):363–71.
112. Lombardi A, Lazzeroni R, Bersigotti L, Vitale V, Amanti C. The proper KI-67 cut-off in hormone responsive breast cancer: A monoinstitutional analysis with long-term follow-up. *Breast Cancer Targets Ther.* 2021;13:213–7.
113. Trop I, Leblanc SM, David J, Lalonde L, Tran–Thanh D, Labelle M, et al. Molecular classification of infiltrating breast cancer: Toward personalized therapy. *Radiographics.* 2014;34(5):1178–95.
114. Sørli T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(19):10869–74.
115. Sørli T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(14):8418–23.
116. Santos M. Cancro da Mama: Avaliação do Gânglio Sentinela em Exame Extemporâneo. 2011;47. Available from: http://recipp.ipp.pt/bitstream/10400.22/2455/1/DM_MartaSantos_2011.pdf
117. Snook KL, Layer GT, Jackson PA, De Vries CS, Shousha S, Sinnett HD, et al. Multicentre evaluation of intraoperative molecular analysis of sentinel lymph nodes in breast carcinoma. *Br J Surg.* 2011;98(4):527–35.
118. Yasuhiro TamaKI, AKIyama F, Iwase T, Kaneko T, Tsuda H, Sato K, et al. Molecular detection of lymph node metastases in breast cancer patients: results of a multicenter trial using the one-step nucleic acid amplification assay. *Clin Cancer Res.* 2009;15(8):2879–84.
119. Clarke D, Leung E, Chachlani N, Rowlands D, Simon J, Hero I, et al. Intraoperative assessment of sentinel node using *imprint* cytology. *World J Surg.* 2010;34(1):55–61.
120. Layfield DM, Agrawal A, Roche H, Cutress RI. Intraoperative assessment of sentinel lymph nodes in breast cancer. *Br J Surg.* 2011;98(1):4–17.
121. Memar B, Sadeghi R, Ayati NK, Aledavood SA, Tghizadeh A, Naseri S, et al. The value of touch *imprint* cytology and frozen section for intra-operative evaluation of axillary sentinel lymph nodes. *Polish J Pathol.* 2010;61(3):161–5.
122. Fougo JL, Osório F, Costa S, Magalhães A. O estadiamento ganglionar na actualidade. *Revista Portuguesa de Cirurgia.* no27. Sériell. 2013. p. 77–83.
123. Tomasicchio G, Mastropasqua MG, Picciariello A, Montanaro AE, Signorile D, Cirilli A, et al. A New Possible Cut-Off of Cytokeratin 19 mRNA Copy Number by OSNA in the Sentinel Node

of Breast Cancer Patients to Avoid Unnecessary Axillary Dissection: A 10-Year Experience in a Tertiary Breast Unit. *Cancers (Basel)*. 2022;14(14).