



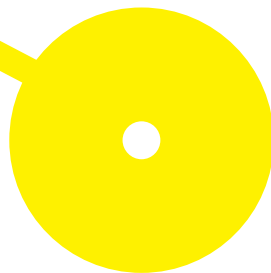
MESTRADO

TÉCNICAS LABORATORIAIS EM BIOPATOLOGIA – PATOLOGIA MOLECULAR

Relação entre a carga tumoral total avaliada por OSNA[®] e a presença de metástases em gânglios linfáticos axilares

Filipa Joia

09/2024





**ESCOLA
SUPERIOR
DE SAÚDE**

**Relação entre a carga tumoral total avaliada por OSNA® e a presença de metástases em
gânglios linfáticos axilares**

Autor

Filipa Alexandra Sousa Joia do Nascimento

Orientador(es)

Prof. Doutora Regina Augusta Alves Pereira da Silva

Escola Superior de Saúde Politécnico do Porto

Prof. Doutora Ana Rita Faria dos Santos

Escola Superior de Saúde Politécnico do Porto

Mestre Cláudia Alexandra Pen de Oliveira Freitas Martins

Unidade Local de Saúde S. José

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

Agradecimentos

Chego ao fim de mais uma etapa importante que não seria possível sem o apoio das pessoas que me envolvem.

Em primeiro lugar, agradeço à minha amiga Cláudia Pen, que já me tinha orientado a monografia da licenciatura e que agora voltou a cair no engano de orientar a dissertação de mestrado. Em equipa que ganha não se mexe. Seres uma das pessoas que fez parte da equipa que validou a metodologia OSNA® em Portugal há mais de 10 anos foi um fator chave na escolha da tua orientação, mas acima de tudo estou grata pela paciência, partilha de conhecimentos e força.

Agradeço também às Professoras Doutoradas Regina Silva e Ana Rita Santos pela orientação e revisão deste trabalho e à Professora Sandra Alves pelo apoio estatístico imprescindível.

Um agradecimento especial ao Técnico Superior Amaro Frutuoso, da ULS Matosinhos, que participou na recolha dos dados, estando sempre disponível para ajudar.

Gostaria de deixar um agradecimento à Sysmex®, e aos seus comerciais, especialmente ao Nuno Geraldo, pelo apoio fornecido em várias alturas do projeto.

Não posso deixar de agradecer o apoio do meu Diretor de Serviço Dr. José Vilchez e Coordenador Técnico Superior Luís Antunes, bem como a todos os meus colegas da ULS Arco Ribeirinho, que me ajudaram nesta aventura gratificante.

Aos meus amigos Mariana e Saulo, este mestrado não existia sem eles, agradeço do fundo do coração o apoio incondicional, as opiniões inteligentes, e claro o sofá.

Por fim, agradeço à minha família e amigos, que sempre acreditaram em mim e me ajudaram em cada passo deste caminho. Vocês foram o pilar que me manteve sã e motivada.

A todos, muito obrigada!

Resumo

No cancro de mama invasivo, a biópsia do gânglio sentinela é a técnica *goldstandard* para aferir o estadiamento axilar. A tecnologia de amplificação num só passo OSNA® permite a análise intraoperatória do gânglio sentinela, através avaliação da carga tumoral total (número de cópias de mRNA da CK19), garantindo rapidez, sensibilidade e menos comorbilidades para as pacientes.

Este estudo tem como objetivo avaliar a associação entre a carga tumoral total e a presença de metástases na linfadenectomia axilar, em pacientes com cancro de mama invasivo em todas as instituições do país que utilizam OSNA®.

Foi elaborado um instrumento de recolha de dados, que foi enviado para doze instituições das quais três participaram no estudo. Foram recolhidas informações referentes à idade das pacientes, tipo, grau e pTN, carga tumoral total e estado da linfadenectomia axilar.

Numa coorte de 128 pacientes com macrometástases nos gânglios analisados intraoperatoriamente, apenas 50 (39,1%) apresentaram gânglios axilares positivos, no entanto a média do valor da carga tumoral total neste grupo foi superior.

Este estudo demonstrou a existência de uma relação significativa entre a carga tumoral total e o tamanho do tumor na presença de metástases axilares.

Palavras-chave: Cancro de mama, gânglio sentinela, OSNA®, carga tumoral total, linfadenectomia axilar

Abstract

In invasive breast cancer, sentinel lymph node biopsy is the gold standard technique for assessing axillary staging. The One Step Nucleic Acid Amplification (OSNA[®]) allows for intraoperative analysis of the sentinel lymph node by evaluating the total tumor load (the sum of CK19 mRNA copies), ensuring speed, sensitivity, and fewer comorbidities for patients.

This study aims to evaluate the association between total tumor load and the presence of metastases in axillary lymphadenectomy in patients with invasive breast cancer across all institutions in the country that utilize OSNA[®]. A data collection instrument was developed and sent to twelve institutions, of which three participated in the study. Information was gathered regarding patient age, type, grade, and pTN, total tumor load, and the status of axillary lymphadenectomy.

In a cohort of 128 patients with macrometastases in the intraoperatively analyzed lymph nodes, only 50 (39.1%) presented with positive axillary nodes; however, the mean value of total tumor load in this group was higher.

This study demonstrated a significant relationship between total tumor load and tumor size in the presence of axillary metastases.

Keywords: Breast cancer, sentinel node, OSNA[®], total tumor load, axillary lymphadenectomy

Índice

1.	Introdução.....	1
1.1.	Cancro de mama.....	1
1.1.1.	Anatomia e fisiologia da mama.....	1
1.1.2.	Fatores de risco e diagnóstico.....	2
1.1.3.	Neoplasia maligna da mama.....	3
1.1.4.	Classificação histológica dos carcinomas invasivos da mama.....	4
1.1.5.	Gânglio sentinela.....	8
1.2.	<i>One Step Nucleic Acid Amplification (OSNA®)</i>	10
1.2.1.	<i>Cutoff</i> e carga tumoral total.....	13
2.	Objetivos.....	15
3.	Métodos.....	16
3.1.	Desenho experimental.....	16
3.2.	Instrumento para recolha de dados dos pacientes.....	16
3.2.1.	Recolha de dados.....	16
3.2.2.	Critérios de inclusão e exclusão.....	17
3.2.3.	Anonimização.....	18
3.3.	População.....	18
3.4.	Análise estatística.....	19
4.	Resultados.....	20
4.1.	Caracterização da população e amostra.....	20
4.2.	Associação entre o número de cópias de mRNA da CK19 e o estado da linfadenectomia axilar.....	23
4.3.	Efeito dos parâmetros clinicopatológicos nos valores da carga tumoral total.....	24
4.4.	Efeito dos parâmetros clinicopatológicos na presença de metástases axilares.....	26
4.5.	Valor preditivo dos parâmetros clinicopatológicos na carga tumoral total.....	27
4.6.	Estudo da sensibilidade e especificidade de diferentes <i>cutoffs</i>	28
5.	Discussão.....	31
6.	Conclusão.....	35
7.	Referências Bibliográficas.....	37
	Anexos.....	I

Anexo I – Critérios pTNM segundo a 8ª edição do AJCC Cancer Staging Manual	I
Anexo II – Protocolo de recolha de dados	II

Índice de abreviaturas e acrónimos

AJCC – *American Joint Committee on Cancer*

ASCO – *American Society of Clinical Oncology*

AUC – *Area Under Curve*

BRCA – *Breast Cancer Gene*

CAP – *College of American Pathologists*

cDNA – *Complementary Deoxyribonucleic Acid*

CK19– *Citoqueratina 19*

CTT – *Carga Tumoral Total*

DNA– *Deoxyribonucleic Acid*

dNTP– *Deoxyribonucleotide triphosphate*

HER2 – *Human Epidermal growth factor Receptor-type 2*

IC – *intervalos de confiança*

ILV – *Invasão Linfovascular*

Ki-67 – *Kiel-67*

LDA – *linfadenectomia axilar*

mRNA – *Messenger Ribonucleic Acid*

NST – *No Special Type*

OR – *odds ratio*

OSNA – *One Step Nucleic Acid Amplification*

p – *Valor prova*

RE – *Recetores de Estrogénio*

RP – *Receptores de Progesterona*

RT-LAMP – *Reverse-transcription Loop-mediated isothermal amplification*

SARS-CoV-2 – *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*

TILs – *Tumour-infiltrating Lymphocytes*

ULS – *Unidade Local de Saúde*

WHO–*World Health Organization*

Índice de tabelas

Tabela 1 – Tipos mais frequentes de carcinomas invasivos da mama e respectivas características, resumo adaptado do Manual de caracterização de tumores da mama da WHO (7).....	8
Tabela 2 – Comparação de diferentes cutoffs encontrados na literatura. Quadro adaptado de Tomasicchio et al.(62).....	14
Tabela 3 – Parâmetros clinicopatológicos analisados neste estudo (n=128).....	22
Tabela 4 – Comparação das médias de número de cópias em pacientes com linfadenectomia positiva e negativa.....	24
Tabela 5 – Efeito dos parâmetros clinicopatológicos nos valores da carga tumoral total.....	25
Tabela 6 – Efeito dos parâmetros clinicopatológicos na presença de metástases axilares.....	26
Tabela 7 – Valor preditivo dos parâmetros clinicopatológicos na carga tumoral total.....	27
Tabela 8 – Efeito do pTN e diferentes cutoffs na presença de metástases axilares. Análise de odds ratios.....	29

Índice de figuras

Figura 1 – Anatomia da mama onde é possível visualizar a sua arquitetura funcional (8).....	2
Figura 2 – Carcinoma ductal in situ e invasivo (15).....	4
Figura 3 – Sinalização do gânglio sentinela.....	9
Figura 4 – Tecnologia RT-LAMP. Formação e amplificação do cDNA para deteção de mRNA da CK19 no equipamento OSNA®. Esquema adaptado do guia de formação OSNA® analisador RD-210 (Sysmex®) (58).....	11
Figura 5 – Caracterização dos resultados das análises OSNA®.....	20
Figura 6 – Número de gânglios analisados por OSNA® em exame extemporâneo.....	21
Figura 7 – Número de gânglios linfáticos analisados histologicamente nas linfadenectomias axilares.....	23
Figura 8 – Relação entre a sensibilidade e especificidade da CTT para predição de metástases axilares.....	28

1. Introdução

O cancro de mama é o tumor mais frequente em mulheres em Portugal (32%), onde morrem por ano cerca de 1700 mulheres com tumores malignos da mama (24%) (1–3).

O tratamento de cada paciente varia com o tipo de tumor, grau, envolvimento axilar e presença de metástases, para além de critérios clínicos (4,5). A Anatomia Patológica e a Imagiologia são os meios complementares fortemente envolvidos no diagnóstico destas patologias uma vez que permitem determinar o tamanho do tumor primário, o seu comportamento molecular e caracterização histológica, resistência/sensibilidade a fármacos e citotóxicos (como terapias endócrinas, imunoterapia ou agentes alquilantes, taxanos ou antraciclinas), presença de gânglios linfáticos suspeitos e mesmo a existência de metástases à distância. Assim, com estes dados, o Senologista/Cirurgião poderá tomar as decisões terapêuticas mais adequadas a cada caso (6).

A patologia mamária é muito vasta englobando lesões inflamatórias, não oncológicas, tumores benignos muito frequentes como os fibroadenomas e neoplasias (7).

Esta dissertação aborda as neoplasias epiteliais mamárias malignas, propondo-se a estudar a relação da presença de macrometástase de carcinoma invasivo da mama em gânglios linfáticos analisados intraoperatoriamente com a existência de metástases na respetiva linfadenectomia axilar (LDA).

1.1. Cancro de mama

1.1.1. Anatomia e fisiologia da mama

A mama é um órgão par, glandular e funcional. A glândula mamária pode ser considerada uma modificação altamente especializada de uma glândula sudorípara apócrina. Tal como as presentes na pele, surge de proliferações epiteliais, de origem ectodérmica (7–9).

Histologicamente, são identificados dois tipos de tecido: epitelial e estromal. O componente epitelial (células cuboides ou cilíndricas) reveste os ductos enquanto o estroma, constituído por tecido conjuntivo e adiposo, envolve os canais e alvéolos secretores. O epitélio glandular é constituído por um sistema ramificado de canais e ductos que formam entre 15 a 25 unidades

glandulares independentes (lobos). Os lobos estão dispostos radialmente em volta do mamilo permitindo ligação ao exterior do corpo pelos canais galactóforos (Figura 1) (8).

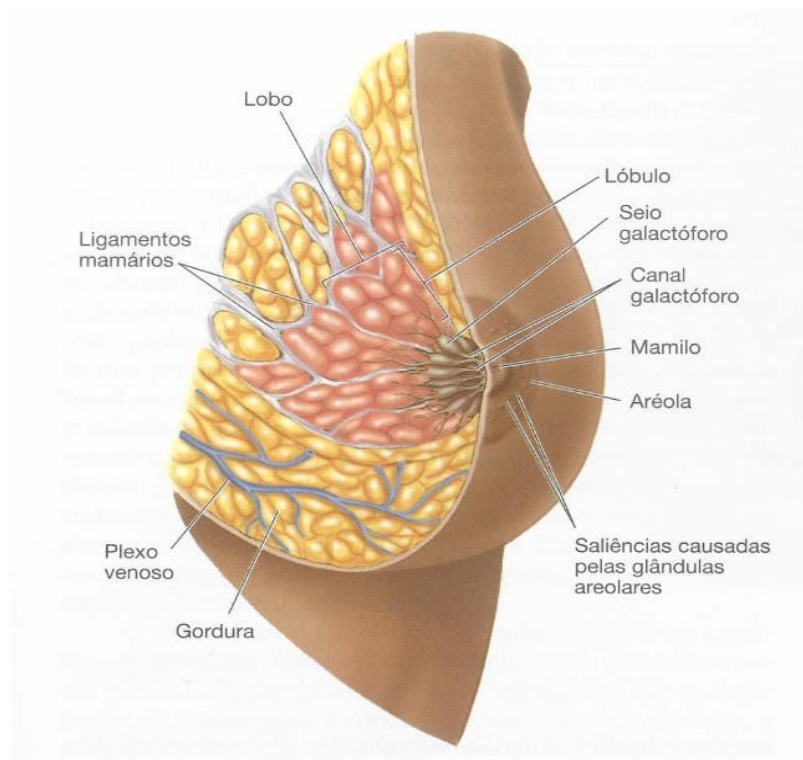


Figura 1 – Anatomia da mama onde é possível visualizar a sua arquitetura funcional (8). A mama é constituída por um sistema ramificado de canais e ductos que formam os lobos. Os lobos estão dispostos radialmente em volta do mamilo permitindo ligação ao exterior do corpo pelos canais galactóforos (8).

As patologias mais frequentes na mama são benignas (fibroadenomas, quistos, entre outras), no entanto, o cancro de mama é a doença oncológica mais prevalente em mulheres de todo o mundo (1).

1.1.2. Fatores de risco e diagnóstico

Em Portugal, a Liga Portuguesa Contra o Cancro é responsável, desde 1986, pelo rastreio do cancro de mama. Este rastreio possibilita um diagnóstico precoce de lesões pequenas que muitas vezes não são palpáveis, permitindo tratamentos menos agressivos e invasivos. As mulheres abrangidas pelo rastreio têm mais de 50 anos e fazem um exame radiológico gratuito de 2 em 2 anos, como recomendado pelas normas nacionais e internacionais (4–6,10,11). Adicionalmente, se a paciente tem história familiar de cancro, esta monitorização deve

ser mais apertada podendo recorrer a ressonância magnética da mama anualmente além da mamografia de rastreio (5,11). O Programa Nacional para as Doenças Oncológicas lançado em 2020 prevê alargar a cobertura destes programas de rastreio para alcançar 90% da população-alvo no que respeita ao cancro da mama (12). Os rastreios populacionais são importantes, uma vez que 20% dos fatores de risco associados a esta doença são evitáveis (5).

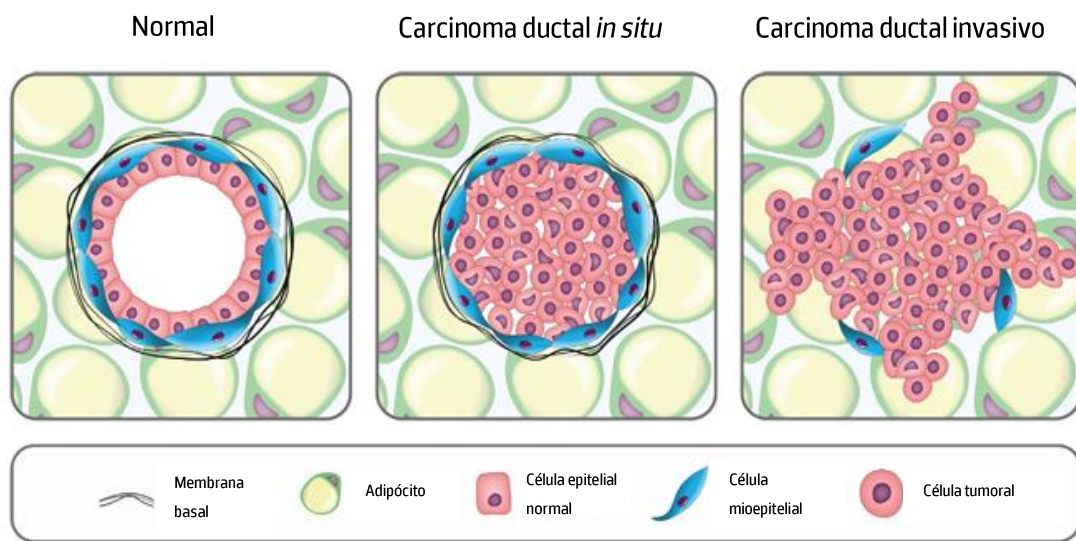
Os fatores de risco para o desenvolvimento de neoplasia da mama incluem fatores genéticos (cerca de 10%) e ambientais (5,13). Uma das síndromes mais frequentes associadas a cancro de mama, é a Síndrome Hereditária de Cancro da Mama e Ovário, caracterizada por mutações familiares nos genes *Breast Cancer (BRCA) 1* e *BRCA 2* (14). Estes pacientes têm até 85% de maior risco de desenvolver neoplasias da mama e até 40% de desenvolverem cancro no ovário, sendo por isso necessário estudar geneticamente a família e, se possível, tomar medidas preventivas como cirurgias redutoras de risco ou aumentar a vigilância imagiológica (5,14). Fatores ambientais como exposição excessiva a estrogénios (terapia de substituição prolongada), obesidade, densidade mamária, nuliparidade, exposição a radiação ionizante, ou a dieta podem influenciar o desenvolvimento de tumores malignos da mama (5,13).

O diagnóstico de cancro de mama baseia-se em evidências clínicas (nódulo palpável, corrimento mamilar, dor, alterações cutâneas, entre outras) e imagiológicas (recorrendo a exames mamográficos). Este diagnóstico é confirmado por histologia (através de biópsia eco-guiada) onde o tumor é caracterizado molecularmente (5,11).

1.1.3. Neoplasia maligna da mama

Muitos carcinomas da mama têm início nas células dos ductos e lóbulos e podem ser *in situ* ou invasivos (7,9).

O carcinoma *in situ* é caracterizado por um agrupamento de células anormais que permanecem circunscritas ao local de origem, sem capacidade de invasão dos tecidos adjacentes ou dos vasos sanguíneos e linfáticos, ou seja, as células tumorais não ultrapassam a membrana basal e permanecem no epitélio. Quando as células tumorais têm um crescimento para fora dos ductos e lobos, passa a ser considerado carcinoma invasivo (Figura 2) (7,15).



Trends in Cancer

Figura 2 – Carcinoma ductal *in situ* e invasivo (15). Os tumores de mama têm origem nas células dos ductos e lóbulos e podem ser *in situ*, se o agrupamento de células anormais permanecer circunscrito ao local de origem, ou invasivos, caso ultrapassem a membrana basal e se expandam para fora destas estruturas (15).

Nos carcinomas invasivos, as células tumorais têm capacidade de metastizar e invadir outras estruturas podendo disseminar-se por outros órgãos (7,9). A disseminação do cancro de mama invasivo ocorre, principalmente, por duas vias: a via hematogénica e a via linfática. A primeira ocorre após invasão dos tecidos adjacentes e nestes casos as células tumorais entram na circulação sanguínea e podem estabelecer-se noutras partes do corpo, como o pulmão, fígado ou ossos, formando metástases à distância. Na metastização por via linfática as células tumorais entram na circulação linfática através dos vasos próximos do tumor e acumulam-se nos gânglios (16,17).

A classificação dos tumores da mama está amplamente regulada por normas, diretrizes e recomendações, tanto nacionais como internacionais (4,7,11,18–20).

1.1.4. Classificação histológica dos carcinomas invasivos da mama

O termo carcinoma invasivo da mama refere-se a todas as neoplasias malignas epiteliais dos elementos glandulares da mama e estas devem ser classificadas pela sua morfologia segundo as guias de classificação da *World Health Organization* (WHO) (7). Assim, a classificação histológica deve identificar o tipo de tumor baseado na arquitetura e características do estroma, o grau histológico segundo o *Nottingham Combined Histologic Grade*, a presença ou

ausência de invasão linfovascular (ILV) e se há associação com componente *in situ*. Outras características que devem ser incluídas na classificação incluem o tamanho do tumor, a sua distância às margens cirúrgicas, características moleculares e presença de *Tumour-infiltrating Lymphocytes* (TILs) (5,7,11,21,22).

Os tipos histológicos de carcinoma invasivo variam com o padrão celular expressado pelo tumor em pelo menos 90% da área observada, ou seja, carcinoma tubular, ductal, lobular ou mucinoso. Tumores que apresentam um padrão misto ou não correspondem na sua totalidade ao mesmo tipo de padrão histológico são classificados como carcinomas de tipo não especial, do inglês *invasive carcinoma no special type* (NST) (7,11).

O *Nottingham Combined Histologic Grade* confere uma pontuação de 1 a 3 às características da formação de túbulos e glândulas, ao pleomorfismo nuclear e à quantificação de mitoses. A soma das pontuações indica o resultado: entre 3 e 5, corresponde a grau 1, 6 ou 7 – grau 2, e 8 ou 9 grau 3 (7,22).

A análise da invasão linfovascular não é considerada obrigatória, porém tem valor significativo no prognóstico das pacientes. Deve ser analisada nos vasos sanguíneos e linfáticos na borda do tumor e deve ser tido em consideração que a retração provocada pelo tumor pode mimetizar a ILV (7,11).

A presença de componente *in situ* (carcinoma ductal *in situ*) está muitas vezes relacionada com os carcinomas ductais invasivos, e deve ser descrita nos relatórios (22). Um dos modelos de carcinogênese da mama considera o carcinoma ductal *in situ* como um precursor de malignidade (7,11).

O tamanho do tumor não só vai fazer parte da classificação patológica da *American Joint Committee for Cancer* (AJCC) TNM (T para tumor primário, N para gânglios linfáticos regionais e M para metástases à distância), como representa um fator de risco importante (7,19,21). Este sistema de classificação de tumores começou a ser usado em 1959 e tem vindo a ser atualizado com o avanços da medicina e ciências biomédicas (7,11,18,19,23). Os resultados podem ser divididos em TNM baseado em evidências clínicas e imagiológicas (cTNM) e após estudo anátomo-patológico (pTNM) (5,23). A classificação para as metástases à distância (M) não é válida no sistema pTNM, apenas com base em evidências clínicas (cMO: sem evidência clínica ou imagiológica de metástases à distância; cMO(i+): não há evidência clínica ou imagiológica de metástases à distância, mas há evidência molecular ou microscópica de células tumorais circulantes ou depósitos de células tumorais disseminadas não maiores que

0,2 mm na medula óssea ou em outros gânglios linfáticos não-regionais; ou cM1: metástases à distância detetadas). Todavia, pM1 pode ser considerado se for confirmada histologicamente a presença de metástases à distância maiores que 0,2 mm (5,19,23). Com os avanços terapêuticos, a manutenção da doença residual tornou-se alvo de estudo. Assim, a classificação para a caracterização da doença residual é, segundo este sistema, ypTNM (TNM após terapia neoadjuvante) (23). O sistema TNM permite que os profissionais comuniquem da mesma forma por todo o mundo, garantindo uma padronização que reflete a carga tumoral. Este trabalho vai utilizar a classificação patológica e os critérios estão resumidos no anexo I. A presença ou ausência de margens cirúrgicas atingidas pelo tumor vai determinar o tipo de tratamento a seguir, condicionando severamente a reabilitação da paciente (7,11).

Os subtipos definidos pelos biomarcadores recetores de estrogénio (RE), e *Human Epidermal growth factor Receptor-type 2* (HER2), recetor do tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano, estão relacionados com perfis genómicos e transcriptómicos distintos bem como diferenças significativas na resposta aos tratamentos (7,11,24).

Estes marcadores de prognóstico juntamente com os recetores de progesterona (RP), e o marcador de proliferação Kiel-67 (Ki-67), não só caracterizam e subdividem os tumores mamários como fornecem informações valiosas sobre o prognóstico e terapêutica (7,9,11,24). A expressão nuclear dos recetores hormonais RE e RP deve ser avaliada por imunohistoquímica visto serem preditivos de resposta a terapêutica endócrina. Os tumores RE-positivos e os RE-negativos têm algoritmos terapêuticos diferentes. Segundo as normas do *College of American Pathologists* (CAP) através da *American Society of Clinical Oncology* (ASCO) recomenda-se que as expressões destes dois recetores, avaliadas por imunohistoquímica, acima de 1% nas células tumorais sejam consideradas positivas, enquanto valores inferiores a 1% devem ser considerados negativos (7,11,24).

O HER2 pertence à classe de recetores de fatores de crescimento que regulam a proliferação celular, crescimento e sobrevivência (24). Em condições normais este recetor encontra-se com baixa expressão na superfície das células epiteliais da mama. Em alguns carcinomas invasivos o gene que codifica para o HER2 encontra-se amplificado o que leva a uma sobreexpressão da proteína na superfície da célula (25). Este aumento de recetores vai induzir a proliferação e está relacionado com o aumento da agressividade dos tumores. Atualmente, já estão disponíveis terapias dirigidas para este recetor pelo que é imperativo que sejam testadas (4,22). Tal como os recetores hormonais, o HER2 pode ser estudado por

imunohistoquímica sendo os resultados possíveis: 0 e 1+ (negativos), 2+ (intermédio/inconclusivo) e 3+ (positivo). Os resultados com expressão intermédia devem ser sujeitos a um teste reflexo por hibridação *in situ* (7,11,24). Recentemente começou a ser estudado o conceito de HER2-Low, ou seja, um resultado 1+ que devido à heterogeneidade tumoral, deixa de ser considerado negativo e permite terapêutica com anticorpos conjugados específicos (26).

O índice de proliferação não é considerado um requerimento para o diagnóstico histológico, no entanto o seu valor prognóstico faz com que seja importante ser aprofundado (22). A proteína Ki-67 é expressa quando as células estão em divisão e nunca em fase de repouso (fase G0). Um índice de proliferação Ki-67 alto (acima de 30% avaliado por imunohistoquímica) significa que as células estão a dividir-se muito rapidamente indicando agressividade e crescimento do tumor. Este índice pode também servir de fator preditivo de resposta à quimioterapia (27).

Alterações no estroma podem surgir como resposta ao crescimento do tumor. Cada vez mais é importante estudar o microambiente tumoral. Assim, é possível encontrar proliferação fibroblástica, escasso tecido conjuntivo ou marcada hialinização, bem como necrose e/ou presença de TILs, linfócitos presentes no estroma do tumor que refletem a resposta imune contra as células malignas (28). A presença de TILs está associada com melhor prognóstico e resposta a terapia neoadjuvante pelo que o seu estudo é cada vez mais importante (11,22,28). Tendo em conta estas características histológicas e moleculares, de acordo com a WHO, os tumores invasivos podem ser identificados como carcinoma invasivo NST, carcinoma microinvasivo, carcinoma lobular, carcinoma tubular, carcinoma mucinoso, carcinoma invasivo micropapilar, entre outros menos frequentes (7). As principais características e diferenças destes tumores estão resumidas na Tabela 1.

Tabela 1 – Tipos mais frequentes de carcinomas invasivos da mama e respetivas características, resumo adaptado do Manual de caracterização de tumores da mama da WHO (7).

Tipos histológicos	Principais características
Carcinoma invasivo NST	Corresponde ao grupo de tumores que não tem uma característica morfológica distinta. Normalmente definidos pela expressão dos biomarcadores RE e HER2. Podem apresentar padrões morfológicos mistos, medular, com diferenciação neuroendócrina, entre outros.
Carcinoma microinvasivo	Este carcinoma apresenta menos de 1 mm de tamanho e é definido como pT1mi. Tem um grande componente de carcinoma <i>in situ</i> .
Carcinoma lobular invasivo	Este tipo de tumor apresenta células dispersas individualmente ou em arranjos em fila indiana. Está muitas vezes relacionado com mutações germinativas que afetam o gene que codifica a proteína E-caderina. A maioria expressa RE e RP e tem HER2 com baixa expressão.
Carcinoma tubular invasivo	Carcinoma invasivo de baixo grau composto por túbulos bem formados com lúmen revestido por uma única camada de células neoplásicas. É mais frequente em mulheres com mais de 70 anos.
Carcinoma mucinoso invasivo	É caracterizado por aglomerados de células epiteliais tumorais suspensos em mucinas extracelulares. Macroscopicamente tem aspeto nodular e gelatinoso.
Carcinoma invasivo micropapilar	Histologicamente é composto por aglomerados pequenos de células malignas, formando mórulas. A maioria destes tumores tem grau de Nottingham 2 ou 3.
NST - <i>no special type</i> RE – receptores de estrogénio HER2 - <i>Human Epidermal growth factor Receptor-type 2</i> RP – Receptores de progesterona	

1.1.5. Gânglio sentinela

Para estabelecer um diagnóstico mais completo e escolher o tratamento mais adequado, é necessário estudar o envolvimento da axila e especialmente quando se trata de carcinomas invasivos (4,11).

Os gânglios linfáticos são estruturas nodulares, interligadas pelos vasos linfáticos, cuja função é filtrar a linfa (removendo microrganismos e toxinas) e são a principal via de disseminação das células tumorais (8).

Dois terços das pacientes diagnosticadas com cancro de mama que apresentam metástases linfáticas axilares irão apresentar metástases noutros órgãos (29).

A presença de células tumorais nos gânglios axilares, em pacientes com cancro de mama, está descrita como fator de mau prognóstico. A baixa sobrevivência de pacientes com tumores

metastáticos reforça a importância de perceber os princípios da invasão do cancro de mama, começando pelos gânglios linfáticos regionais (11).

Durante muitos anos, a linfadenectomia axilar foi o procedimento mais comum para se avaliar o envolvimento da axila, no entanto, desde os anos 90 que se tem vindo a demonstrar a importância do estudo do gânglio sentinela, o primeiro gânglio a drenar do tumor e o que mais probabilidade tem de apresentar invasão (30). A linfadenectomia axilar apresenta comorbilidades a longo prazo, sendo a mais frequente o linfedema, que consiste na acumulação de linfa nos tecidos superficiais do membro superior operado, levando ao aumento do volume do mesmo. Esta sequela não é reversível, apesar de poder ser atenuada por tratamentos drenantes e fisioterapia, tornando-se limitante e impactando a qualidade de vida da paciente (17).

Atualmente, no cancro de mama invasivo, a biópsia do gânglio sentinela é a técnica *goldstandard* para aferir o estadiamento e envolvimento axilar (Figura 3) (4,11,30).

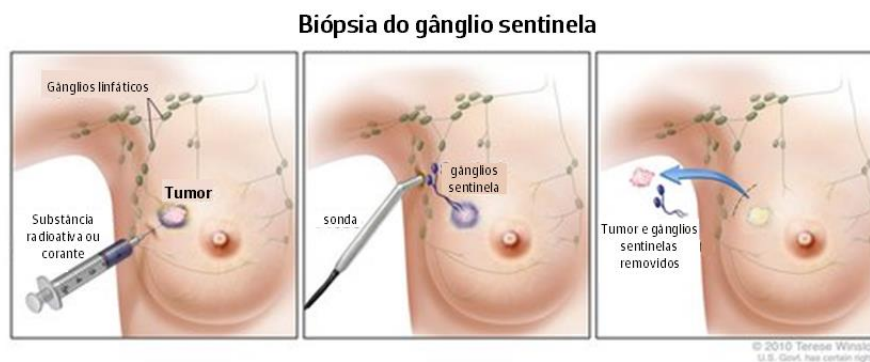


Figura 3 – Sinalização do gânglio sentinela. É injetado no tumor um corante ou substância radioativa que se dispersa pela cadeia linfática axilar. O primeiro gânglio a receber o corante ou substância radioativa é chamado de gânglio sentinela e é removido para análise. Esquematização adaptada de Winslow T.

avaliação patológica dos gânglios regionais (pN) deve ser realizada de diferente forma consoante o resultado clínico da avaliação da axila, sendo que pode ser omitida a linfadenectomia axilar se o resultado do estudo do gânglio sentinela for negativo ou positivo para micrometástase (4,31).

Até à implementação do diagnóstico molecular, os Serviços de Anatomia Patológica dispunham de três métodos para avaliar o gânglio sentinela da mama: 1) processamento histopatológico em parafina, 2) corte de congelação e 3) estudo citológico por *imprint*. O primeiro envolve um processamento com a duração de pelo menos um dia, pelo que quando é necessária uma resposta imediata durante a cirurgia, recorria-se ao corte de congelação, onde

o gânglio é congelado rapidamente e seccionado em determinados intervalos num criostato e as lâminas daí provenientes são coradas, sendo, posteriormente, avaliadas ao microscópio pelo Médico Patologista. Apesar desta ser, ainda, a prática de muitos locais, as divergências de protocolo bem como a incerteza quanto à perda de material, tornam-na pouco reprodutível e com baixa sensibilidade. O estudo citológico é rápido e útil em macrometástases de grandes dimensões, visíveis macroscopicamente, mas não permite avaliar mais do que duas superfícies de corte do gânglio. Todos estes métodos morfológicos têm como principal limitação a impossibilidade de avaliar todo o gânglio sentinela (32,33).

Nos últimos anos tem-se assistido a um crescimento na necessidade de uniformizar estes procedimentos e com o desenvolvimento tecnológico associado aos estudos moleculares surge uma técnica que garante reprodutibilidade, fiabilidade, sensibilidade e especificidade (34).

1.2. One Step Nucleic Acid Amplification (OSNA®)

A tecnologia de amplificação num só passo OSNA®, da Sysmex® permite a análise intraoperatória do gânglio sentinela da mama, fornecendo resultados rapidamente (34).

Os equipamentos OSNA® RD-100i e RD-210 utilizam um método de amplificação isotérmica de *Deoxyribonucleic Acid* (DNA) mediada por *loop*, *Reverse-transcription Loop-mediated isothermal amplification* (RT-LAMP), pesquisando *Messenger Ribonucleic Acid* (mRNA) da citoqueratina 19 (CK19), com a adição de uma reação mediada pela transcriptase reversa no início da amplificação (Figura 4). O RT-LAMP foi desenvolvido no início dos anos 2000 pela empresa japonesa Eiken Chemical Co. Ltd (35), e veio revolucionar a deteção de material genético sem recurso a termocicladores e de forma muito mais específica e rápida. Esta tecnologia é frequentemente utilizada em pesquisas rápidas de DNA viral em várias infeções, nomeadamente a infeção pelo *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (SARS-CoV-2) (36–39).

A tecnologia OSNA® foi descrita pela primeira vez em 2007 por Tsujimoto *et al.* (40), comparando métodos convencionais de análise de gânglios sentinela intraoperatoriamente com a pesquisa de marcadores moleculares. Dos vários marcadores estudados pela equipa de Tsujimoto, a CK19, marcador de células epiteliais não presente em gânglios linfáticos normais, foi a que obteve resultados mais precisos. Além disso, outros autores avaliaram a presença de

CK19 nos vários tipos de tumor da mama e estabeleceram uma relação entre a expressão desta proteína pelo tumor (avaliada por imunohistoquímica na biópsia mamária) e a sua presença nos gânglios linfáticos metastizados (40–42). A CK19 é expressa na maioria dos tumores de mama, no entanto, deve ser sempre confirmada por imunohistoquímica na biópsia de diagnóstico. Casos em que a CK19 é negativa, ou seja, o tumor não expressa esta proteína, não devem ter os gânglios sentinela estudados por OSNA®, já que pode induzir falsos negativos (41–43).

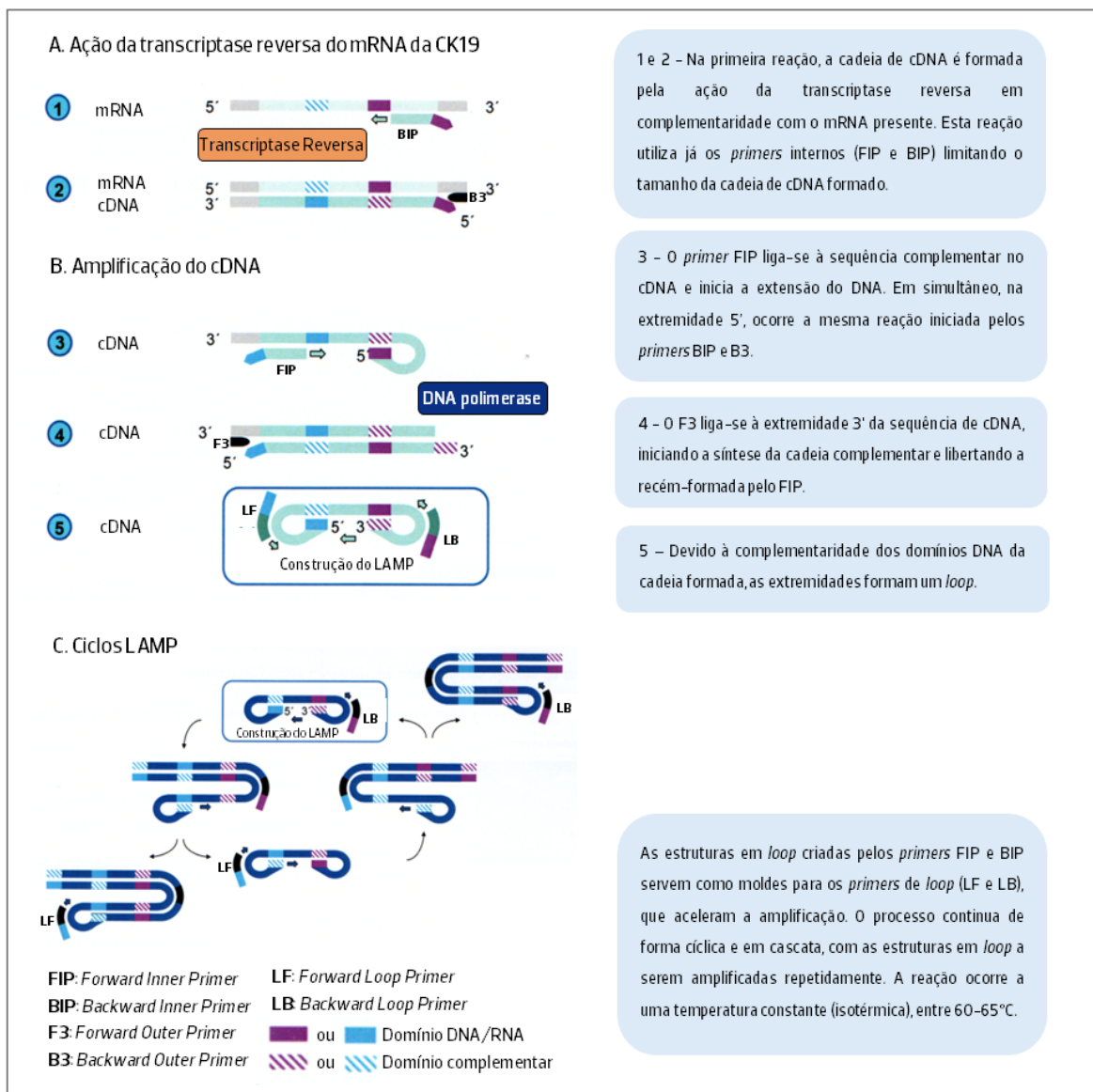


Figura 4 - Tecnologia RT-LAMP. Formação e amplificação do cDNA para deteção de mRNA da CK19 no equipamento OSNA®. Esquema adaptado do guia de formação OSNA® analisador RD-210 (Sysmex®) (58)

Os estudos conduzidos por Tsujimoto *et al.* e confirmados por outros autores posteriormente, comprovam que o ensaio OSNA[®] é específico, sensível e reprodutível (33,40,44–52). Analisando amostras de mRNA da CK19 com e sem a presença de lisado de gânglio linfático comprova que este ensaio amplifica a CK19 independentemente do conteúdo ganglionar, além disso, comparação com amostras com DNA genómico purificado de gânglios linfáticos provou que apenas o mRNA da CK19 é amplificado, garantindo a especificidade deste método (40).

O exame extemporâneo de gânglio sentinela é benéfico para o paciente já que elimina a necessidade de recorrer novamente ao bloco operatório, no entanto a variabilidade de observação entre Patologistas nos métodos histológicos, bem como as consequências das técnicas, podem ter resultados menos objetivos (32,33,53–55).

O OSNA[®], apesar de ter um custo de implementação superior às outras técnicas apresentadas, fornece um diagnóstico intraoperatório preciso e evita testes adicionais, levando a uma redução de custos por paciente a longo prazo, quer em cirurgias posteriores como em tratamento de comorbidades associadas (56–58).

Este método analisa todo o gânglio linfático e permite dentro da mesma corrida a avaliação de mais do que um gânglio, podendo assim ser incluídos gânglios satélite, sem acréscimo de tempo de espera (34). A metodologia OSNA[®] segue um protocolo específico, recomendado pela marca, igual para todas as instituições, tornando-a reprodutível e padronizada: o gânglio é homogeneizado num tubo com Lynorhag[®], um reagente que estabiliza as moléculas de mRNA e protege-as da ação das ribonucleases, formando o lisado OSNA[®], que é então analisado no equipamento (59,60). No fim da amplificação, os resultados são apresentados sob a forma quantitativa (número de cópias de mRNA de CK19 por μL de amostra) e qualitativa (negativo, micrometástases e macrometástases) e indicam, de forma sucinta e de fácil interpretação, o envolvimento axilar da paciente (34,40). De acordo com as *guidelines* existentes, uma macrometástase é definida por um foco metastático com ≥ 2 mm de maior eixo (11,23), assim assume-se que no ensaio OSNA[®] esta dimensão corresponda à quantidade de mRNA de CK19 presente em 2^3 mm^3 do foco metastático (40).

Uma limitação deste ensaio é a destruição dos gânglios linfáticos não permitindo estudos microestruturais como a avaliação da extensão extracapsular nos casos positivos (5,61). Como tal, já se encontram a decorrer estudos de expressão génica com o lisado OSNA[®] com o objetivo de identificar novos biomarcadores relacionados com o microambiente tumoral nos gânglios linfáticos (61).

1.2.1. *Cutoff* e carga tumoral total

O primeiro *cutoff* definido para o método OSNA® foi o de Tsujimoto *et al.*, em que >5000 cópias de mRNA da CK19/ μ L corresponde a macrometástase; entre 250 e 5000 a micrometástase e <250 cópias de mRNA da CK19/ μ L ausência de metástase (40).

Vários autores (33,45,51,52) propuseram alterações a estes valores uma vez que estudos complementares mais recentes promovem a apreciação da carga tumoral total (CTT) como fator preditor de metástases em gânglios linfáticos não sentinela. A CTT em gânglios analisados por OSNA® foi descrita pela primeira vez em 2013, por Peg *et al.* como sendo a soma da quantidade de cópias de mRNA de CK19 presente em todos os gânglios positivos analisados e esta foi, também, a primeira vez que o *cutoff* utilizado foi questionado, sendo sugerido um novo de 15 000 cópias (33). Em 2017, Nabais *et al.*, num estudo retrospectivo numa instituição portuguesa, sugeriu um *cutoff* de 190 000 cópias numa amostra de 58 pacientes (Tabela 2) (52).

Recentemente, um dos estudos com mais impacto na avaliação da CTT como fator preditivo de metástases nas linfadenectomias, o estudo PORTTLE, realizado em várias instituições do país com uma amostra superior a 500 pacientes, determinou como novo *cutoff* as 30 000 cópias (Tabela 2) (51).

Para além de confirmar a eficácia e precisão da metodologia OSNA®, Tomasicchio *et al.*, definiram um *cutoff* de 9150 cópias com uma amostra de 1339 pacientes, com uma sensibilidade de 94% e especificidade de 67,3%, sendo o grupo de trabalho com resultados estatisticamente mais significantes (Tabela 2)(62).

Outro estudo importante, o NEOVATTL, aferiu o valor preditivo e prognóstico da CTT em pacientes que fizeram terapia neoadjuvante, concluindo que uma CTT superior a 15 000 cópias era preditiva de envolvimento axilar e que superior a 25 000 cópias estava associada a maior risco de recorrência da doença (63).

Ainda no estudo da CTT, um conjunto de instituições espanholas realizou o projeto MOTTO cujo objetivo foi avaliar o impacto do subtipo molecular do tumor de mama na CTT, para prever a afetação dos gânglios axilares, não tendo encontrado evidências suficientes para considerar o subtipo molecular para decisões terapêuticas (64).

Os autores supracitados concordam que a CTT é a medida que melhor espelha a realidade axilar e que os *cutoffs* utilizados devem ter em consideração outras características dos pacientes, havendo muita variabilidade nos valores propostos.

Tabela 2 – Comparação de diferentes *cutoffs* encontrados na literatura. Quadro adaptado de Tomasicchio *et al.*(62)

Estudo	n ++	Cutoff (nº de cópias CK19)	Método
Tsujimoto <i>et al</i>(40)		5 000	<i>Maximal copy</i>
Tomasicchio <i>et al</i> (62)	202	9 150	<i>Maximal copy</i>
Deambrogio <i>et al</i> (65)	117	7 700	
Pina <i>et al</i> (47)	197	5 000	<i>Maximal copy</i>
Peg <i>et al</i> (33)	697	15 000	CTT
Nabais <i>et al</i> (52)	58	190 000	CTT
Fougo <i>et al</i> (51)	579	30 000	CTT
Terrenato <i>et al</i> (66)	172	2 150*	CTT

++ macrometástases; CTT – carga tumoral total; * cutoff para negativos

2. Objetivos

Este projeto tem como objetivo principal estabelecer uma relação entre a carga tumoral total, avaliada por OSNA[®], em gânglios linfáticos axilares de pacientes com cancro de mama, com a existência de metástases nas respectivas linfadenectomias. Especificamente, com este trabalho pretende-se avaliar a possibilidade de definir um novo *cutoff* de cópias de mRNA de CK19, que seja preditivo de metástases nas linfadenectomias axilares.

Um outro objetivo do presente estudo é averiguar a associação entre os dados clinicopatológicos das pacientes e o número de cópias de mRNA da CK19 que apresentam nos gânglios analisados por OSNA[®] e a presença de metástases axilares, pretendendo testar a eficácia destas características clínicas como fatores preditores de envolvimento axilar.

3. Métodos

3.1. Desenho experimental

Este projeto consiste num estudo observacional, retrospectivo e sem intervenção, ou seja, são recolhidos dados passados, sem manipulação ou intervenção nas variáveis.

Este estudo pretende avaliar a associação entre o número de cópias de CK19 existente nos gânglios positivos analisados por OSNA® e a existência de metástases axilares nas linfadenectomias das mesmas pacientes em todas as instituições que dispõem desta metodologia em Portugal.

3.2. Instrumento para recolha de dados dos pacientes

O instrumento utilizado para a recolha de dados dos pacientes neste projeto consiste num documento informativo, o protocolo de dados de recolha (Anexo II), que foi enviado a todas as instituições participantes no estudo. Este documento detalha os dados necessários para a investigação, bem como as diretrizes sobre como obtê-los de maneira sistemática e padronizada. A elaboração deste instrumento teve como objetivo garantir a consistência e a qualidade das informações recolhidas, facilitando a comparação e a análise dos dados entre as diferentes instituições.

O documento inclui uma lista específica de dados clinicopatológicos a serem registados: idade das pacientes (no momento da análise OSNA®), tipo histológico do tumor, *status* RE, RP, HER2 e Ki-67, pTN, Grau de *Nottingham*, número de gânglios analisados por OSNA®, resultado quantitativo da análise molecular (CTT), número de gânglios axilares analisados na linfadenectomia axilar e número de gânglios positivos nesta.

3.2.1. Recolha de dados

Os dados para este trabalho foram recolhidos através da criação de mapas de pacientes com diagnóstico nos *softwares* internos dos Serviços de Anatomia Patológica participantes utilizando como filtro as codificações usadas em cada Serviço, como a topografia de mama e gânglio linfático e o tipo de exame (biópsia, peça oncológica, exame extemporâneo). Estas informações foram agrupadas numa tabela Excel.

Estas informações foram recolhidas entre abril e julho de 2024 com a colaboração de recursos humanos selecionados pelos Serviços participantes.

3.2.2. Critérios de inclusão e exclusão

A amostra escolhida consiste em pacientes do género feminino diagnosticadas com cancro de mama invasivo e submetidas a cirurgia com exame intraoperatório por OSNA[®], cujo resultado tenha sido positivo para macrometástase usando o *cutoff* definido por Tsujimoto *et al.* (39) e que tenham realizado linfadenectomia axilar; entre 01 de janeiro de 2018 e 31 de dezembro de 2023 (6 anos).

Após revisão sistemática, foram excluídos pacientes do género masculino, por não existirem estudos suficientes que garantam a reprodutibilidade do OSNA[®] nestes pacientes.

Excluíram-se pacientes com patologia mamária não invasiva, por não apresentarem critérios para realização da técnica OSNA[®], e tumores bilaterais, uma vez que não tendo acesso aos processos clínicos dos pacientes não seria possível recolher informação sobre o comportamento tumoral nas duas mamas em todas as instituições.

O equipamento RD-100i (Sysmex[®]), exclusivamente, apresenta uma funcionalidade em que recorre a amostras inibidas para colmatar resultados ambíguos. Como este resultado só pode ser consultado no equipamento não seria possível recolher as informações necessárias para o estudo, assim estas amostras foram excluídas.

Foram também excluídas as pacientes com resultados que apresentem células tumorais isoladas, pois nestes casos o equipamento fornece uma estimativa de número de cópias (<250 cópias) e não o valor concreto.

Não se consideram para este estudo pacientes que não tenham sido submetidas a linfadenectomia axilar ou que não apresentem o valor da CTT.

Dos casos reunidos apenas os que obtiveram resultados positivos para macrometástase foram caracterizados histológica e molecularmente.

Algumas informações foram consideradas essenciais (CTT e estado da linfadenectomia) e outras opcionais. Nos parâmetros de caracterização das pacientes (biomarcadores, pTN e Grau de Nottingham) foi permitida a falta de informação, sendo esta designada por "sem informação".

3.2.3. Anonimização

A anonimização foi realizada através da eliminação de dados identificativos, como o nome dos pacientes, nos arquivos Excel enviados pelas instituições participantes. Este processo foi conduzido pelos Serviços de Anatomia Patológica envolvidos na pesquisa, garantindo que as informações recolhidas fossem desassociadas de qualquer identificação pessoal.

Em algumas instituições foi assinado um termo de responsabilidade, a garantir que seriam cumpridos os princípios éticos e normas estabelecidas pela Comissão de Ética em Saúde da instituição, garantindo a confidencialidade dos dados utilizados no projeto, observando os preceitos da Declaração de Helsínquia, da WHO, da União Europeia e do Regulamento Geral de Proteção de Dados.

3.3. População

A população alvo deste estudo é composta pelas instituições que utilizam a metodologia OSNA® para a análise de gânglios sentinela da mama intraoperatoriamente. O contato foi estabelecido por via eletrónica com todos os Diretores e Coordenadores dos Serviços de Anatomia Patológica de 12 instituições públicas do país, que são reconhecidas pela utilização desta metodologia: Unidade Local de Saúde (ULS) Arco Ribeirinho (hospital do Barreiro), ULS São José (hospital São José), ULS Almada-Seixal (hospital Garcia da Orta), ULS Alto Minho (hospital de Viana do Castelo), ULS Matosinhos (hospital Pedro Hispano), ULS São João (hospital São João), Centro Hospitalar Universitário Santo António, ULS Viseu Dão-Lafões, ULS Coimbra, ULS Lezíria (hospital distrital de Santarém), ULS Alentejo Central (hospital de Évora) e ULS Santa Maria (hospital Santa Maria). Para a realização da pesquisa, foi enviado o instrumento de recolha de dados, previamente descrito, às instituições que manifestaram interesse em participar.

Este projeto, com o protocolo de recolha de dados acima mencionado, foi submetido à aprovação na ULS Arco Ribeirinho e aceite com parecer favorável da Comissão de Ética para a Saúde, do Encarregado de Proteção de Dados Pessoais, do Responsável da Academia de Formação e Gabinete da Qualidade, da Unidade de Investigação Clínica e do Conselho de Administração.

Algumas instituições optaram por validar o parecer ético da ULS Arco Ribeirinho, enquanto outras solicitaram a emissão de pareceres de suas respectivas Comissões de Ética.

3.4. Análise estatística

Os dados foram codificados, organizados e agrupados num documento *Microsoft Office Excel* e tratados estatisticamente no *software IBM Statistical Package for the social Sciences (SPSS)* versão 29.0.1.0.

Foi realizada uma análise de frequências, medida de tendência central (média) e dispersão (mínimo e máximo) nos parâmetros analisáveis.

Foi usado o Teste T para amostras independentes para verificar se a diferença entre os valores da CTT no grupo de pacientes com LDA negativa e positiva é estatisticamente significativa.

A correlação entre as variáveis categóricas e as variações dos valores da CTT (variável numérica) foi avaliada através do coeficiente de correlação de Spearman (para variáveis com dois grupos) e o teste ANOVA (para variáveis com mais de dois grupos), uma vez que estes dados não seguem uma distribuição normal (segundo teste Shapiro-Wilk).

Para analisar a associação entre os parâmetros clinicopatológicos e o estado da LDA foi utilizado o teste do Qui-quadrado de Pearson (para variáveis categóricas).

Para a análise da sensibilidade e especificidade da CTT com os resultados das linfadenectomias foi construída uma curva *Receiver Operating Characteristic (ROC)* e foi aplicado um modelo de regressão logística.

Foram considerados estatisticamente significativos valores prova (p) de $p < 0,05$, com intervalos de confiança (IC) de 95%.

4. Resultados

4.1. Caracterização da população e amostra

O número de respondentes ao instrumento de recolha de dados foram 3 (25%), sendo que 5 (42%) aguardam autorização das respetivas comissões de ética para futura inserção no estudo.

Foram recolhidos dados de 1223 pacientes, das quais 958 (78%) correspondem a casos com análise OSNA® negativa e 265 (22%) a positiva. Destes, 123 (46%) apresentaram micrometástases e 142 (54%) macrometástases (Figura 5).

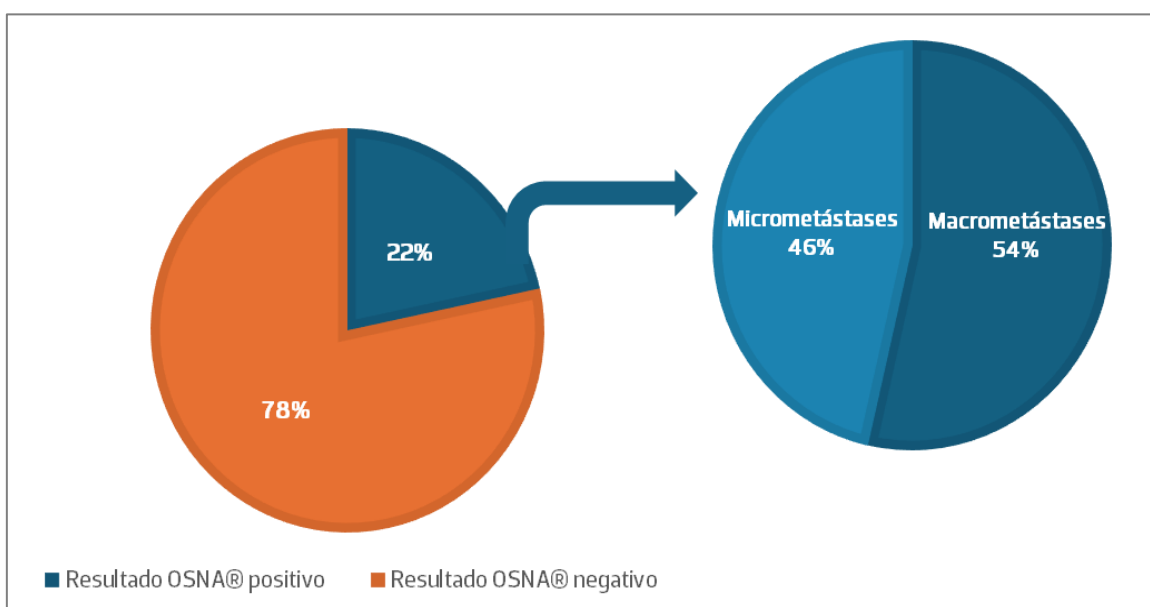


Figura 5 – Caracterização dos resultados das análises OSNA®. Dos dados recolhidos (n=1223), 78% (n=958) correspondem a resultados OSNA® negativos e 22% (n=265) a positivos. Destes positivos, 46% (n=123) correspondem a micrometástases enquanto 54% (n=142) correspondem a macrometástases.

Este estudo incidiu sobre as pacientes com resultados positivos para macrometástase (142) na análise do gânglio sentinela pelo método de OSNA®, das quais 14 foram excluídas por falta de informação sobre a CTT ou estado da linfadenectomia, dados considerados essenciais para o estudo.

Assim, das 128 pacientes estudadas (Tabela 3), a média de idades foi de 59,41 ($\pm 12,75$) anos. A idade mínima representada neste estudo foi 28 anos e a máxima 88. O grupo etário mais representado situa-se entre os 50 e os 69 anos, o que representa 53,9% da população deste estudo.

A recolha dos parâmetros clinicopatológicos revela que o tipo de tumor mais frequente é o carcinoma invasivo de tipo não especial com 100 (78,1%) pacientes. Os tumores de maiores dimensões (pT2: Tumor > 20 mm mas ≤ 50 mm de maior eixo) representaram 42,2% da amostra com 54 pacientes. Neste estudo foram unidas as categorias de pN0 e pN1 por existirem divergências na redação dos relatórios uma vez que alguns patologistas consideraram o gânglio sentinela como parte do pN e assim classificaram como pN1a(sn) e outros não, colocando pN0. Assim 84 (65,6%) pacientes tinham pN0 ou pN1. No grau de Nottingham, observou-se que 66 (51,6%) das pacientes apresentam grau 2. Importa referir que nesta população, 106 (82,8%) pacientes apresentam status HER2 negativo, 120 (93,8%) apresentam RE positivo e 108 (84,4%) RP também positivo. No parâmetro do índice de proliferação, 65 (50,8%) das pacientes apresentaram resultado intermédio, ou seja, entre 5% e 30% de células marcadas com o anticorpo Ki-67 (Tabela 3).

No OSNA® foram analisados em média 2,23 (±1,21) gânglios, sendo o máximo registado 7 nódulos, por paciente. Em exame extemporâneo (intraoperatório) 43 (34%) pacientes tiveram um gânglio removido e analisado por OSNA®, 40 (31%) removeram 2 gânglios e 45 (35%) analisaram 3 ou mais gânglios (Figura 6).

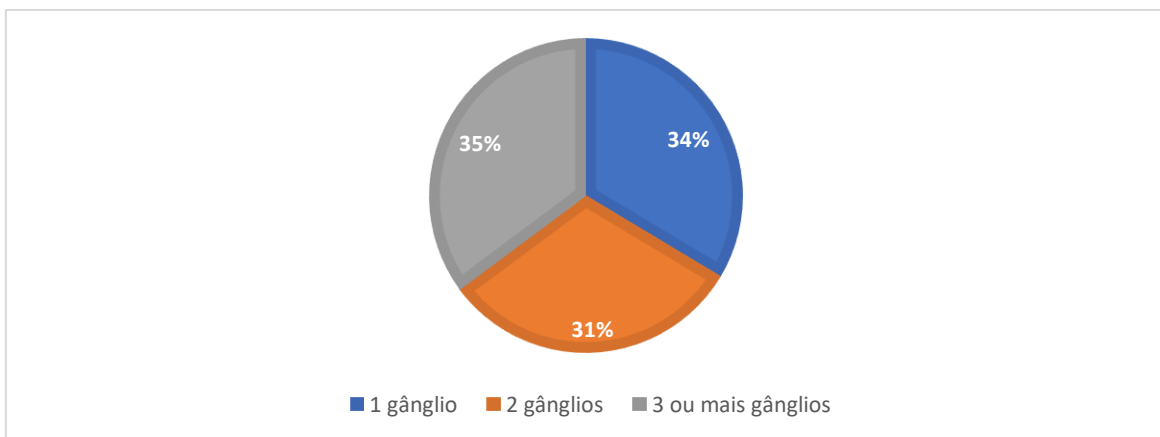


Figura 6 - Número de gânglios analisados por OSNA® em exame extemporâneo. 34% (n=43) dos pacientes tiveram apenas um gânglio analisado intraoperatoriamente, 31% (n=40) analisaram dois gânglios e 35% (n=45) analisaram 3 ou

Na avaliação das linfadenectomias axilares foram analisados em média 11,47 (±6,14) gânglios por paciente e 78 (60,9%) destes pacientes não apresentaram metástases axilares (Tabela 3). No conjunto de pacientes com metástases axilares (50 pacientes, correspondente a 39,1% da amostra), estima-se uma média de 1,20 (±2,64) gânglios positivos por linfadenectomia. Nas linfadenectomias axilares positivas, 29,7% das pacientes apresentam até 3 gânglios metastizados e apenas 9,4% tem 4 ou mais (Figura 7).

Tabela 3 – Parâmetros clinicopatológicos analisados neste estudo (n=128). Os parâmetros de caracterização da amostra foram categorizados e agrupados. As idades das pacientes foram agrupadas em faixas etárias (menos de 49 anos, 50 a 69 anos e mais de 70 anos). Os tipos de tumor foram categorizados em NST, lobular e outros. Os parâmetros do TNM foram agrupados pelos seus níveis, assim como o grau de Nottingham. Os biomarcadores e as linfadenectomias foram separados em positivos e negativos.

Parâmetros Clinicopatológicos		n	%	
Idades (ao diagnóstico)	[≤ 49 anos]	29	22,7	
	[50 – 69]	69	53,9	
	[≥70]	30	23,4	
Tipo de Tumor	Carcinoma Invasivo NST	100	78,1	
	Carcinoma Lobular Invasivo	20	15,6	
	Outro	8	6,3	
pT (TNM)	S/ info	23	18,0	
	pT1	37	28,9	
	pT2	54	42,2	
	≥pT3	14	10,9	
pN (TNM)	S/ info	23	18,0	
	pN0 ou pN1	84	65,6	
	≥pN2	21	16,4	
Grau	S/ info	28	21,9	
	G1	16	12,5	
	G2	66	51,6	
	G3	18	14,1	
Biomarcadores	HER2	S/ info	12	9,4
		Negativo	106	82,8
		Positivo	10	7,8
	RE	S/ info	4	3,1
		Negativo	4	3,1
		Positivo	120	93,8
RP	S/ info	6	4,7	
	Negativo	14	10,9	
	Positivo	108	84,4	
Ki-67	S/ info	4	3,1	
	Baixo	23	18,0	
	Intermédio	65	50,8	
	Alto	36	28,1	
Linfadenectomia axilar	Negativa	78	60,9	
	Positiva	50	39,1	

NST - tipo não especial, S/ info - Sem informação, HER2 - Human Epidermal growth factor Receptor-type 2, RE - Recetores de Estrogénio, RP - Recetores de Progesterona

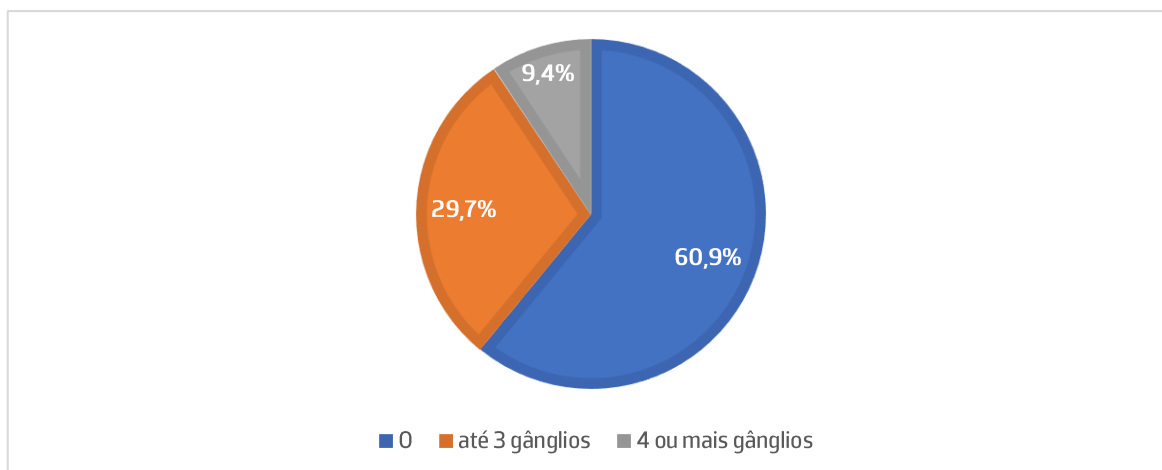


Figura 7 – Número de gânglios linfáticos analisados histologicamente nas linfadenectomias axilares. 60,9% (n=78) dos pacientes que tiveram linfadenectomia negativa, ou seja, sem gânglios positivos. 29,7% (n=38) apresentaram até 3 gânglios positivos e em 9,4% (12) identificaram-se 4 ou mais gânglios com metástases.

4.2. Associação entre o número de cópias de mRNA da CK19 e o estado da linfadenectomia axilar

Para verificar se existiam diferenças estatisticamente significativas entre os valores de CTT e a presença de metástases nas respectivas LDA, foi realizado o teste paramétrico T *Student* para amostras independentes (Tabela 4) com o objetivo de comparar as médias de CTT dos grupos com LDA positiva e negativa, uma vez que estes dados seguem uma distribuição normal. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$.

Assim os resultados do teste indicam uma diferença significativa nos valores da CTT entre os grupos com linfadenectomia negativa e positiva ($p = 0,026$).

A média de CTT do grupo com metástases axilares ($812144,60 \pm 1932075,05$) foi significativamente maior que a média do grupo negativo ($175167,44 \pm 480183,15$), apesar disso, os desvios padrões elevados indicam variabilidade dentro dos valores estudados em cada grupo.

Tabela 4 – Comparação das médias de número de cópias em pacientes com linfadenectomia positiva e negativa. Foi realizado o teste T *Student* para comparar as médias dos valores de CTT dos dois grupos de pacientes (LDA positiva e negativa). O valor *p* sublinhado refere-se ao valor estatisticamente significativo ($p < 0,05$). É observada uma diferença significativa nos valores da CTT entre os grupos com linfadenectomia negativa e positiva.

	LDA	n	Média	Desvio Padrão	<i>p</i>
CTT	Negativa	78	175167,44	480183,15	<u>0,026</u>
	Positiva	50	812144,60	1932075,05	

4.3. Efeito dos parâmetros clinicopatológicos nos valores da carga tumoral total

Procurou-se compreender o impacto que as características biológicas e tumorais podem ter na variação do número de cópias de mRNA da CK19 nos gânglios analisados por OSNA®.

Foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman (para variáveis com dois grupos) e teste ANOVA (para variáveis com mais de dois grupos) para analisar estes parâmetros, visto que estes dados não seguem uma distribuição normal (teste Shapiro-Wilk $p < 0,05$).

Foi analisada a correlação existente entre os parâmetros clinicopatológicos com a variação dos valores de CTT (Tabela 5), ou seja, se há oscilações significativas no valor de número de cópias de mRNA da CK19, consoante existência de determinadas características.

Tabela 5 – Efeito dos parâmetros clinicopatológicos nos valores da carga tumoral total.

O valor *p* sublinhado refere-se ao valor estatisticamente significativo ($p < 0,05$). O coeficiente de correlação de Spearman foi utilizado para variáveis categóricas com dois grupos e o teste ANOVA para variáveis com mais de dois grupos em relação a uma variável numérica (CTT). O único parâmetro com efeito na variação dos valores da CTT foi o estado das linfadenectomias ($p < 0,001$).

	Parâmetro	Coefficiente de correlação	<i>p</i>
CTT	Idade	-0,120	0,892
	HER2	0,019	0,834
	RE	0,097	0,276
	RP	0,011	0,900
	Ki-67	0,044	0,619
	Tipo de Tumor	-0,013	0,886
	pT (TNM)	0,060	0,504
	pN (TNM)	0,011	0,233
	Grau	-0,015	0,870
	LDA	0,293	<u><0,001</u>

Das variáveis estudadas, apenas o estado da linfadenectomia foi considerado estatisticamente significativo ($p < 0,001$). As outras variáveis não mostram correlações significativas ($p > 0,05$), sugerindo que não há relação estatisticamente relevante entre elas e a carga tumoral total.

4.4. Efeito dos parâmetros clinicopatológicos na presença de metástases axilares

Verificou-se a existência ou não de associação entre as variáveis do estudo e a presença de metástases nas linfadenectomias axilares com o teste do Qui-quadrado de Pearson (Tabela 6). Foi escolhido este teste visto que a LDA é uma variável categórica.

Tabela 6 – Efeito dos parâmetros clinicopatológicos na presença de metástases axilares
Os valores p sublinhados referem-se aos valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$). O teste do qui-quadrado de Pearson foi utilizado para avaliar a associação entre os parâmetros clinicopatológicos e a presença de metástases nas linfadenectomias. O pT ($p = 0,022$) e pN ($p < 0,001$) apresentam significado estatístico.

	Parâmetro	Qui-quadrado	p
LDA	Idade	0,301	0,860
	HER2	0,044	0,978
	RE	0,709	0,702
	RP	4,220	0,121
	Ki-67	3,779	0,286
	Tipo de Tumor	3,230	0,199
	pT (TNM)	9,601	<u>0,022</u>
	pN (TNM)	29,167	<u><0,001</u>
	Grau	2,821	0,420

LDA – linfadenectomia axilar, HER2 – *Human Epidermal growth factor Receptor-type 2*, RE – Recetores de Estrogénio, RP – Recetores de Progesterona, CTT – Carga tumoral total

Os resultados sugerem que características tumorais, nomeadamente o pT ($p = 0,022$) e o pN ($p < 0,001$) são fatores importantes a serem considerados na avaliação da presença de metástases axilares. As outras características tumorais não mostraram uma influência significativa ($p > 0,05$).

O pN era esperado que fosse considerado estatisticamente relevante, uma vez que representa o estado da axila, ou seja, o valor de pN representa a invasão nos gânglios regionais.

4.5. Valor preditivo dos parâmetros clinicopatológicos na carga tumoral total

Para avaliar o impacto que as características do tumor podiam ter nos valores de CTT, realizou-se uma regressão linear (Tabela 7).

Tabela 7 – Valor preditivo dos parâmetros clinicopatológicos na carga tumoral total. O valor *p* sublinhado refere-se ao valor estatisticamente significativo ($p < 0,05$). A regressão linear permitiu averiguar o valor preditivo dos parâmetros clinicopatológicos, sendo que o único estatisticamente significativo foi o estado dos gânglios linfáticos regionais (pN) com $p = 0,012$.

	Parâmetro	Coefficiente (B)	Desvio Padrão	<i>p</i>
CTT	Idade	82049,586	171415,049	0,633
	HER2	-261703,127	315822,365	0,409
	RE	124663,986	410819,854	0,762
	RP	-154155,478	334493,506	0,646
	Ki-67	321622,899	175416,107	0,069
	Diagnóstico	-335709,699	212901,157	0,118
	pT (TNM)	-49844,866	177019,329	0,779
	pN (TNM)	773879,483	302792,198	<u>0,012</u>
	Grau	-191006,762	144257,625	0,188

CTT – Carga tumoral total, HER2 – Human Epidermal growth factor Receptor-type 2, RE – Recetores de Estrogénio, RP – Recetores de Progesterona,

Com base nos resultados, a única variável que tem um efeito significativo na CTT é pN ($p = 0,012$). As outras variáveis não são significativas ($p > 0,05$), indicando que não têm um efeito preditivo significativo nos valores de carga tumoral total, ou seja, as características clinicopatológicas não fazem aumentar os valores de CTT.

O parâmetro Ki-67, que representa o índice de proliferação do tumor, está próximo de ser significativo ($p = 0,069$), apesar de não o ser.

4.6. Estudo da sensibilidade e especificidade de diferentes *cutoffs*

Usando apenas a CTT como valor preditor de metástases, foi elaborado um estudo de sensibilidade e especificidade através da curva ROC (Figura 8).

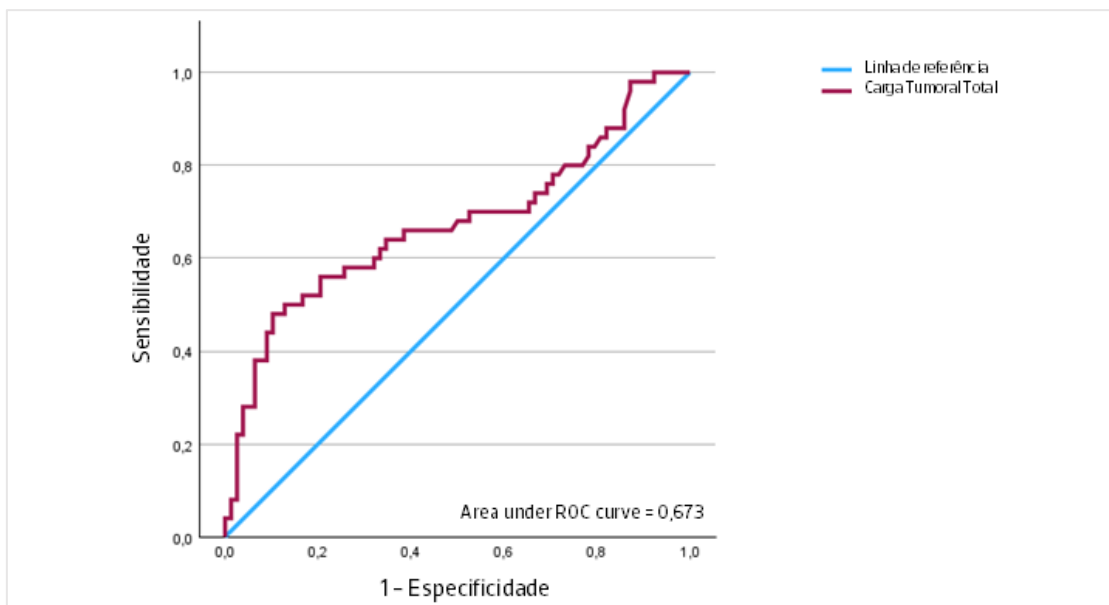


Figura 8 – Relação entre a sensibilidade e especificidade da CTT para predição de metástases axilares. Curva ROC com AUC=0,673 ($p=0,001$, com IC 95% 0,571 - 0,775).

O resultado da curva ROC foi uma *area under curve* (AUC) de 0,673 ($p=0,001$, com intervalos de confiança de 95% com limite inferior de 0,571 e superior 0,775).

Foram selecionados três *cutoffs* com base nos valores de sensibilidade e especificidade fornecidos pela análise ROC: 10 000 cópias (sensibilidade 92,0%, especificidade 85,9%), 20 000 cópias (sensibilidade 80,0%, especificidade 73,1%), e 30 000 cópias (sensibilidade 72,0%, especificidade 65,4%), e realizadas regressões logísticas para verificar se apresentavam alterações estatisticamente significativas na presença de metástases axilares. Foi realizada uma análise univariável (para analisar o efeito de cada variável independentemente) e multivariável, utilizando apenas as variáveis que apresentaram significado estatístico nas análises anteriores (Tabela 8).

Tabela 8 – Efeito do pTN e diferentes *cutoffs* na presença de metástases axilares. Análise de *odds ratios*. Os valores *p* sublinhados referem-se aos valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$). Os parâmetros sombreados correspondem à categoria de referência para a OR. Na regressão logística univariável e multivariável observa-se que o pT apresenta significado estatístico, na análise independente, e podem ser analisadas as OR (OR=2,765 IC95% 1,136–6,729); o pN é avaliável tanto individualmente como em conjunto com os outros parâmetros ($p < 0,001$) como era esperado. Os *cutoffs* selecionados não apresentam significado estatístico pelo que não é possível assumir que há uma probabilidade maior de ter linfadenectomias positivas se os valores forem superiores à referência.

Parâmetro	n=128	LDA		Análise univariável		Análise multivariável	
		POS	NEG	OR (IC95%)	<i>p</i>	OR (IC95%)	<i>p</i>
pT (TNM)	S/ info	9 (7,0)	14 (10,9)				
	pT1	9 (7,0)	28 (21,9)	2,765 (1,136–6,729)	<u>0,025</u>	2,341 (0,836–6,556)	0,105
	≥pT2	32 (25)	36 (28,1)				
pN (TNM)	s/info	9 (7,0)	14 (10,9)				
	pN0/pN1	22 (17,2)	62 (48,4)	26,773 (5,762–124,393)	<u><0,001</u>	24,551 (5,179–116,372)	<u><0,001</u>
	≥pN2	19 (14,8)	2 (1,6)				
CTT 10000 cópias	≤10000	4 (3,1)	11 (8,6)	1,888 (0,566–6,296)	0,301	1,247 (0,222–7,022)	0,802
	>10000	46 (35,9)	67 (52,3)				
CTT 20000 cópias	≤20000	10 (7,8)	21 (16,4)	1,474 (0,627–3,464)	0,374	1,670 (0,265–10,523)	0,585
	>20000	40 (31,3)	57 (44,5)				
CTT 30000 cópias	≤30000	14 (10,9)	27 (21,1)	1,361 (0,628–2,951)	0,435	0,744 (0,167–3,304)	0,697
	>30000	36 (28,1)	51 (39,8)				

LDA – linfadenectomia axilar, POS – positivo, NEG – negativo, OR – Odds Ratio, IC95% – Intervalos de confiança 95%, CTT – carga tumoral total, s/info – sem informação

Na análise univariável, o parâmetro do tamanho do tumor pT, tem uma *odds ratio* (OR) de 2,765, sugerindo que a probabilidade de um resultado positivo na LDA é aproximadamente

2,8 vezes maior para tumores de maiores dimensões (>pT2) em relação aos tumores menores (pT1) ($p=0,025$). No entanto, na análise multivariável, o efeito não é significativo ($p=0,105$).

Tanto na análise univariável quanto na multivariável, o parâmetro pN está fortemente associado a um aumento significativo na probabilidade das LDA serem positivas, com OR de 26,773 e 24,551, respectivamente, e valores p altamente significativos ($p<0,001$). Esta associação já era esperada visto o pN representar a invasão dos gânglios regionais.

No *cutoff* de 10 000 cópias, 4 (3,1%) das 128 pacientes têm valores de CTT abaixo das 10 000 cópias e linfadenectomia positiva e 67 (52,3%) têm valores superiores à referência e linfadenectomia negativa. Com o aumento do *cutoff* observa-se uma subida nesta variação com 10 (7,8%) pacientes com CTT inferior a 20 000 cópias com LDA positiva e 57 (44,5%) com carga tumoral total superior a 20 000 cópias, mas linfadenectomia negativa. No grupo com CTT inferior a 30 000 cópias há 14 (10,9%) pacientes com linfadenectomia positiva e 51 (39,8%) com mais de 30 000 cópias e LDA negativa. Pela análise univariável e multivariável é possível verificar que estes *cutoffs* não são estatisticamente significativos, apresentando valores p acima de 0,05, ou seja, não é possível assumir que há uma probabilidade maior de ter linfadenectomias positivas se os valores forem superiores ao valor de referência.

5. Discussão

A abordagem conservadora da axila eleva a importância do estudo do gânglio sentinela, quer seja pré-operatória (imagiológica e com recurso a biópsias de agulha fina), intraoperatória ou pós-operatória (32). A remoção cirúrgica do gânglio para análise histológica não extemporânea é mais morosa e cerca de 20% envolvem uma segunda cirurgia (32). Assim o melhor método é aquele que é efetuado durante a cirurgia mamária, limitando a exposição da paciente a outras cirurgias complexas.

A introdução do conceito da CTT em substituição da utilização como referência de apenas o valor do gânglio com mais cópias de mRNA da CK19 trouxe uma consciencialização sobre a importância do valor do número de cópias aquando da tomada de decisão de se fazer esvaziamento axilar (46,51,64).

A preferência pela análise do gânglio sentinela em vez do esvaziamento axilar foi inicialmente desenhado para um conjunto de pacientes que se inserem em características próprias previstas no estudo clínico randomizado ACOSOG Z0011, onde não era previsto a utilização de tratamentos neoadjuvantes antes da análise dos gânglios sentinela (67). Atualmente, muitas pacientes que são submetidas a remoção do gânglio sentinela já fizeram algum tipo de tratamento neoadjuvante (68).

O OSNA[®] é um método molecular para deteção de mRNA de CK19 em gânglios linfáticos com eficácia verificada por vários autores e em uso desde 2007 por muitas instituições (32,33,40,48,69). Este método demonstra maior capacidade em detetar micrometástases, provando ser mais sensível que os métodos convencionais (*imprint* citológico e histopatologia) (46,70,71). É também uma metodologia automática, reprodutível e rápida diminuindo os tempos de resposta e garantindo a padronização da técnica (46,71). Estudos recentes demonstram a eficácia desta metodologia não só em cancro de mama como também noutros tumores (72,73). É de esperar que esta tecnologia se torne rotina em grande parte dos centros o que torna importante garantir que traz benefícios para os pacientes a longo prazo (57,74).

O *cutoff* utilizado para a análise OSNA[®] pela maioria das instituições ainda é o definido por Tsujimoto *et al.*, baseado na correlação entre o número de cópias de CK19 e o tamanho histológico das metástases, assim, menos de 250 cópias/ μ L corresponde a ausência de metástase, entre 250 e 5000 cópias/ μ L a micrometástase e mais de 5000 cópias/ μ L a macrometástase (40).

Foram contactadas 12 instituições portuguesas que dispõem da metodologia OSNA[®], das quais 3 forneceram dados para o projeto e 5 estão a aguardar resposta das respetivas comissões de ética.

Este estudo analisou 128 pacientes com número de cópias de CK19 igual ou superior a 5000 nos gânglios linfáticos analisados intraoperatoriamente com OSNA[®], antes da realização das linfadenectomias axilares. Destas pacientes, 78 (60,9%) não tinham gânglios positivos nos esvaziamentos axilares. Esta discrepância já estudada por vários autores levou muitos autores a questionar o *cutoff* utilizado, adicionando outros fatores preditivos de envolvimento axilar na decisão médica (47,51,52,62,69).

A maioria das pacientes neste estudo apresentou carcinoma invasivo de tipo não especial (78,1%), sendo o segundo mais frequente o carcinoma lobular invasivo (15,6%). Importa referir que nos biomarcadores, 106 (82,8%) pacientes apresentaram *status* de HER2 negativo, e 120 (93,8%) e 108 (84,4%) pacientes apresentaram RE e RP positivos, respetivamente. Estes resultados significam, habitualmente, melhor prognóstico e agressividade baixa (13,75). A pouca representatividade de tumores de diferentes tipos dificultou a correlação entre as características histológicas e os valores da CTT ou o estado da linfadenectomia.

Há uma associação entre o número de cópias de mRNA da CK19 e o estado da linfadenectomia axilar. Ao compararmos as médias de CTT dos pacientes com LDA positiva com os negativos, observamos que apesar da média ser significativamente superior no grupo com LDA positiva, levando a crer que valores mais elevados de CTT podem estar relacionados com metástases axilares, os desvios padrões demonstram que estes valores são muito variáveis dentro dos grupos. Assume-se que existe relação entre o valor da CTT e a existência de metástases ($p=0,026$) no entanto também existe muita variabilidade de valores dentro do grupo positivo e negativo. O estudo do efeito da LDA nos valores da CTT também foi significativo ($p<0,001$) confirmando o teste anterior.

Os parâmetros clinicopatológicos com efeito significativo na presença de metástases axilares foram o tamanho do tumor (pT) e os gânglios regionais (pN). O pT apresentou uma associação significativa com a existência de metástases axilares ($p=0,022$), ou seja, quanto maior o tamanho do tumor mais possibilidade há das LDA apresentarem invasão. Este achado é consistente com os diversos artigos já publicados sobre o tema (51,62). Pela análise das *odds ratio*, foi possível mostrar que uma paciente com um tumor pT2 ou superior apresenta 2,8 vezes mais possibilidade de ter linfadenectomia positiva do que uma paciente com um tumor

pT1 ($p=0,025$). O pN, apesar de estatisticamente apresentar significância para a presença de metástases nas LDA ($p<0,001$), não tem valor preditivo uma vez que se baseia em características pós-cirúrgicas (estadiamento patológico) e já reflete o estado positivo da linfadenectomia, sendo aconselhada a utilização de evidências clínicas (cN) para a seleção de pacientes para OSNA® (4).

Na carga tumoral total, o parâmetro com valor preditivo foi apenas o pN ($p=0,012$), no entanto o índice de proliferação (Ki-67) apresentou um valor prova $p=0,069$, que apesar de não ser estatisticamente significativo está próximo do valor de significância $p<0,05$. Estudos aprofundados seriam necessários para correlacionar os índices de proliferação mais elevados com valores de CTT maiores.

A análise da sensibilidade e especificidade do *cutoff* conduzida neste projeto levou a uma curva ROC com uma AUC de 0,673 o que está de acordo com as construídas por outros autores (Deambrogio (65): $n=194$, AUC= 0,69; Piñero Madrona (76): $n=797$, AUC=0,69; Shimazu (77): $n=623$, AUC=0,69; Fougo (51): $n=579$, AUC = 0,630), confirmando a relação forte entre a CTT e as metástases axilares.

Os valores de 10 000, 20 000 e 30 000 cópias selecionados neste estudo com base na sua sensibilidade e especificidade não se mostram estatisticamente significativos na regressão logística efetuada ($p>0,05$), no entanto, virtualmente, o *cutoff* de 10 000 cópias pouparia 11 (8,6%) pacientes a linfadenectomia, à custa de 4 (3,1%) com LDA positiva que não seriam detetadas.

Nos valores de 20 000 e 30 000 cópias, não seriam efetuadas LDA em, respetivamente, 21 (16,4%) e 27 (21,1%) pacientes com LDA negativa, mas falhar-se-ia a deteção de 10 (7,8%) e 14 (10,9%) pacientes positivas, respetivamente.

Muitos autores defendem a utilização de mais fatores preditivos como o tipo de tumor, tamanho e grau para avaliar a agressividade da invasão, ou mesmo a possibilidade destas pacientes não realizarem a LDA, mas sim terapia adjuvante dirigida à axila como radioterapia, como é o caso dos estudos clínicos AMAROS e SINODAR-ONE (57,74). Estes estudos avaliam a sobrevida de pacientes que fizeram LDA em relação a pacientes que apenas fizeram remoção do gânglio sentinela e radioterapia (AMAROS), ou outro tipo de terapia adjuvante (SINODAR-ONE), sendo os resultados concordantes com a não existência de diferença significativa na sobrevida de pacientes que removeram apenas o gânglio sentinela (positivo) e fizeram terapia adjuvante e pacientes que fizeram esvaziamento axilar.

Apesar de existirem *guidelines*, nacionais e internacionais, para a redação do relatório anatomopatológico, ainda há muita variação entre os vários locais e profissionais (4,11,19,22).

A falta de uniformização levou à exclusão de muitas amostras diminuindo o *n* deste estudo.

A limitação referente à obtenção de mais instituições participantes também condicionou o número de dados e a representatividade da amostra.

Este estudo escolheu utilizar como referência a carga tumoral total, em vez do gânglio com maior número de cópias, por este ser valor com maior concordância entre autores na revisão bibliográfica efetuada (33,45,48,51,52,64,65,69,76).

Na era da medicina de precisão, o conhecimento da biologia tumoral é essencial para a avaliação dos gânglios sentinela na mama, pois estes constituem uma ferramenta para decisão terapêutica personalizada. Compreender as particularidades biológicas do tumor leva a intervenções mais eficazes e menos invasivas, melhorando os resultados clínicos e a qualidade de vida das pacientes.

6. Conclusão

O presente estudo demonstrou uma relação significativa entre a carga tumoral total e a presença de metástases axilares, ou seja, há uma correspondência entre valores mais elevados de CTT com a existência de gânglios positivos nas linfadenectomias, como evidenciado pela análise de *cutoff* que resultou em uma área sob a curva ROC de 0,673, no entanto este é um valor com baixa discriminação, apesar da concordância com outros estudos. Embora os valores de *cutoff* para as 10 000, 20 000 e 30 000 cópias não tenham apresentado valor estatisticamente significativo, a utilização de um *cutoff* de 10 000 cópias, como alternativa ao de 5000, conjuntamente com outros fatores clínicos, como o pT poderia ser benéfico para algumas pacientes.

Além disso, a pesquisa efetuada sublinha a importância de considerar múltiplos fatores preditivos, como o estadiamento clínico da axila, para uma avaliação mais precisa da agressividade da doença.

Nesta *coorte* de 128 pacientes, com CTT superior a 5000 cópias que fizeram LDA, apenas 50 (39,1%) apresentavam gânglios linfáticos axilares positivos, o que significa que as restantes 78 (60,9%) pacientes, com linfadenectomias negativas, foram sujeitas a uma cirurgia complexa e de consequências físicas importantes, sem qualquer benefício clínico para a paciente. Mais estudos de acompanhamento serão necessários para averiguar se estas pacientes tiveram mais do que um gânglio retirado para análise OSNA ou se as linfadenectomias não foram completas.

A variação na redação de relatórios anatomopatológicos foi identificada como um desafio que impactou na representatividade da amostra, sendo necessário mais uniformização nesta área. Em conclusão, este trabalho servirá para consciencializar os responsáveis pela decisão terapêutica, reafirmando que os valores de carga tumoral total têm influência na existência de metástases axilares, no entanto, mais fatores devem ser incluídos na escolha de fazer ou não LDA.

É importante salientar que ainda faltam dados de cinco instituições, o que limita a abrangência dos resultados obtidos até o momento. Assim, está previsto dar continuidade a este estudo, aumentando o número de instituições participantes e, conseqüentemente, a robustez das informações reunidas. A inclusão desses dados adicionais, poderá permitir a obtenção de resultados estatisticamente mais relevantes, contribuindo para um entendimento mais profundo e fundamentado na área.

Por fim, importa referir que é necessário continuar a estudar soluções cirúrgicas, prognósticas e terapêuticas mais precisas e personalizadas, explorando a eficácia de terapias adjuvantes, como a radioterapia, em comparação com a remoção da cadeia linfática axilar, em conjunto com um *cutoff* mais adequado, que garanta melhores condições de vida aos pacientes com cancro de mama.

7. Referências Bibliográficas

1. The International Agency for Research on Cancer. Globocan 2020: Breast [Internet]. 2020 p. 2. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/20-Breast-fact-sheet.pdf>
2. The International Agency for Research on Cancer. Globocan 2020: Portugal [Internet]. 2020 p. 2. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/620-portugal-fact-sheets.pdf>
3. RON. Registo Oncológico Nacional de Todos os Tumores na População Residente em Portugal, em 2020. Instituto Português de Oncologia do Porto Francisco Gentil - EPE, ed. Porto, 2023
4. National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Breast cancer guidelines. Versão 4.2023. Março de 2023.
5. Sociedade Portuguesa de Oncologia. Manual de Oncologia SPO Abordagem e tratamento do cancro da mama. edit.on.lab.,lda. 1ª Edição. Dezembro de 2020
6. Direção-Geral da Saúde. Norma 051/2011: Abordagem Imagiológica da Mama Feminina. Dezembro de 2011.
7. Who Classification Of Tumours Editorial Board, International Agency For Research On Cancer, World Health Organization. WHO classification of tumours. Breast Tumours. Lyon: International Agency For Research On Cancer; 2019.
8. Seeley RR, Stephens TD, Tate P, Edizioni Sorbona. Anatomia & fisiologia. Milano: Sorbona; 1993.
9. Russo J. The Pathobiology of Breast Cancer [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2016 [citado 25 de abril de 2024]. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-40815-6>
10. Direção-Geral da Saúde. Norma 028/2012: Tratamento do Cancro da Mama Metastático. Dezembro de 2012.
11. 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. *Annals of Oncology*. agosto de 2019;30(8):1194–220.
10. Programa Nacional para as Doenças Oncológicas (2022). Estratégia Nacional de Luta Contra o Cancro (ENLCC) 2021 a 2030. Direção-Geral da Saúde.
13. Obeagu EI, Obeagu GU. Breast cancer: A review of risk factors and diagnosis. *Medicine*. 19 de janeiro de 2024;103(3):e36905.
14. Joia, F.; Tente, J. BRCA1/2: a new approach to therapy. *Trends in Biomedical Laboratory Sciences*. 2024 Mar 2; 2(1): 3-11

15. Gibson SV, Roozitalab RM, Allen MD, Jones JL, Carter EP, Grose RP. Everybody needs good neighbours: the progressive DCIS microenvironment. *Trends in Cancer*. abril de 2023;9(4):326–38.
16. Stacker SA, Williams SP, Karnezis T, Shayan R, Fox SB, Achen MG. Lymphangiogenesis and lymphatic vessel remodelling in cancer. *Nat Rev Cancer*. março de 2014;14(3):159–72.
17. Koelmeyer LA, Gaitatzis K, Dietrich MS, Shah CS, Boyages J, McLaughlin SA, et al. Risk factors for breast cancer-related lymphedema in patients undergoing 3 years of prospective surveillance with intervention. *Cancer*. 15 de setembro de 2022;128(18):3408–15.
17. World Health Organization. ICD-O International Classification of Diseases for Oncology, Third Edition. 2000.
19. 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 A Cancer J Clinicians*. 8 de julho de 2017;67(4):290–303.
19. Sociedade Portuguesa de Senologia. XVII Jornadas da Senologia. IX Consenso Nacional de Cancro de Mama. 2017;
21. Rakha EA, Tse GM, Quinn CM. An update on the pathological classification of breast cancer. *Histopathology*. janeiro de 2023;82(1):5–16.
21. Rodrigues, V. Pinto, D. Brito, M. *et al.* X Consenso Nacional de Cancro de Mama – Sociedade Portuguesa de Senologia. 2022
22. L F, Page DL, Fleming ID, Fritz AG, Balch CM, Haller DG, et al. *AJCC Cancer Staging Manual* 8^o edition. Springer Science & Business Media; 2013.
23. Khan A, Ellis IO, Hanby AM, Cosar EF, Rakha EA, Kandil D. *Precision Molecular Pathology of Breast Cancer*. Springer; 2015.
25. Rakha EA, Tan PH, Quinn C, Provenzano E, Shaaban AM, Deb R, et al. UK recommendations for HER2 assessment in breast cancer: an update. *J Clin Pathol*. abril de 2023;76(4):217–27.
26. Shirman Y, Lubovsky S, Shai A. HER2-Low Breast Cancer: Current Landscape and Future Prospects. *BCTT*. agosto de 2023;Volume 15:605–16.
27. 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. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 1 de julho de 2021;113(7):808–19.
28. Laenkholm AV, Callagy G, Balancin M, Bartlett JMS, Sotiriou C, Marchio C, et al. Incorporation of TILs in daily breast cancer care: how much evidence can we bear? *Virchows Arch*. janeiro de 2022;480(1):147–62.

29. Gante I, Ribeiro JM, Mendes J, Gomes A, Almeida V, Regateiro FS, et al. One Step Nucleic Acid Amplification (OSNA) Lysate Samples Are Suitable to Establish a Transcriptional Metastatic Signature in Patients with Early Stage Hormone Receptors-Positive Breast Cancer. *Cancers*. 28 de novembro de 2022;14(23):5855.
29. Rodrigues Â, Belo J. The axillary surgery in breast cancer: update Cirurgia axilar no cancro da mama: atualização. *Acta Obstet Ginecol Port* 2021;15(1):23-31
30. Teixeira, C. Análise de gânglios sentinela em cancro de mama o papel do ensaio OSNA na caracterização de micrometástases e macrometástases. Escola Superior de Saúde do Politécnico do Porto. Outubro de 2022
32. Barkur S, Notingher I, Rakha E. Intra-operative assessment of sentinel lymph nodes for breast cancer surgery: An update. *Surgical Oncology*. março de 2022;40:101678.
33. 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*. maio de 2013;139(1):87-93.
34. Sysmex. Osna em cancro da mama. [citado 30 de junho de 2024]. OSNA: diagnóstico molecular de precisão que proporciona valor preditivo e prognóstico. Disponível em: <https://www.sysmex.pt/produtos/products-detail/osna-em-cancro-da-mama/>
35. Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*. 15 de junho de 2000;28(12):63e-63.
36. Zhang X, Zhao Y, Zeng Y, Zhang C. Evolution of the Probe-Based Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assays in Pathogen Detection. *Diagnostics*. 24 de abril de 2023;13(9):1530.
37. Zhang H, Xu Y, Fohlerova Z, Chang H, Iliescu C, Neuzil P. LAMP-on-a-chip: Revising microfluidic platforms for loop-mediated DNA amplification. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. abril de 2019;113:44-53.
38. Hamzan NI, Ab. Rahman N, Suraiya S, Mohamad I, George Kalarakkal T, Mohamad S. Real-time loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of human papillomavirus 16 in oral squamous cell carcinoma. *Archives of Oral Biology*. abril de 2021;124:105051.
39. Esmatabadi MJD, Bozorgmehr A, Zadeh HM, Bodaghabadi N, Farhangi B, Babashah S, et al. Techniques for Evaluation of LAMP Amplicons and their Applications in Molecular Biology. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 3 de dezembro de 2015;16(17):7409-14.
40. Tsujimoto M, Nakabayashi K, Yoshidome K, Kaneko T, Iwase T, Akiyama F, et al. One-step Nucleic Acid Amplification for Intraoperative Detection of Lymph Node Metastasis in Breast Cancer Patients. *Clinical Cancer Research*. 15 de agosto de 2007;13(16):4807-16.

41. Alvarenga CA, Paravidino PI, Alvarenga M, Dufloth R, Gomes M, Zeferino LC, et al. Expression of CK19 in invasive breast carcinomas of special histological types: implications for the use of one-step nucleic acid amplification. *J Clin Pathol*. 1 de junho de 2011;64(6):493.
42. Vilardell F, Novell A, Martin J, Santacana M, Velasco A, Díez-Castro MJ, et al. Importance of assessing CK19 immunostaining in core biopsies in patients subjected to sentinel node study by OSNA. *Virchows Arch*. junho de 2012;460(6):569–75.
43. Fujisue M, Nishimura R, Okumura Y, Tashima R, Nishiyama Y, Osako T, et al. Clinical Significance of CK19 Negative Breast Cancer. *Cancers*. 21 de dezembro de 2012;5(4):1–11.
44. Osako T, Matsuura M, Yotsumoto D, Takayama S, Kaneko K, Takahashi M, et al. A prediction model for early systemic recurrence in breast cancer using a molecular diagnostic analysis of sentinel lymph nodes: A large-scale, multicenter cohort study. *Cancer*. 15 de maio de 2022;128(10):1913–20.
45. Kenny R, Wong G, Gould L, Odofin O, Bowyer R, Sotheran W. Can one-step nucleic acid amplification assay predict four or more positive axillary lymph node involvement in breast cancer patients: a single-centre retrospective study. *annals*. março de 2022;104(3):216–20.
46. Laohawiriyakamol S, Puttawibul P, Mahattanobon S. Efficacy of One-step Nucleic Acid Amplification Assay for Evaluation of Sentinel Lymph Node Metastasis of Breast Cancer in Songklanagarind Hospital. *SMJ*. 21 de fevereiro de 2017;35(1):17.
47. Pina H, Salleron J, Gilson P, Husson M, Rouyer M, Leroux A, et al. Intraoperative prediction of non-sentinel lymph node metastases in breast cancer using cytokeratin 19 mRNA copy number: A retrospective analysis. *Mol Clin Oncol*. 10 de janeiro de 2022;16(3):58.
48. Pegolo E, Puppini C, Gerometta A, Damante G, Puglisi F, Di Loreto C. One-step nucleic acid amplification (OSNA) for intraoperative evaluation of sentinel lymph node status in breast cancer: a comparative study between CK19 protein expression and CK19 mRNA level in primary tumors and lymph node metastasis. *Virchows Arch*. julho de 2013;463(1):7–15.
49. Tamaki Y. One-step nucleic acid amplification assay (OSNA) for sentinel lymph node biopsy. *Breast Cancer*. maio de 2015;22(3):230–4.
50. Shi F, Zhang Q, Liang Z, Zhang M, Liu X. One-step nucleic acid amplification assay is an accurate technique for sentinel lymph node biopsy of breast cancer patients: a meta-analysis. *Br J Cancer*. outubro de 2017;117(8):1185–91.
51. Fougo JL, Amendoeira I, Brito MJ, Correia AP, Gonçalves A, Honavar M, et al. Sentinel node total tumour load as a predictive factor for non-sentinel node status in early breast cancer patients – The porttlet study. *Surgical Oncology*. março de 2020;32:108–14.
52. Nabais C, Figueiredo J, Lopes P, Martins M, Araújo A. Total tumor load assessed by one-step nucleic acid amplification assay as an intraoperative predictor for non-sentinel lymph node metastasis in breast cancer. *The Breast*. abril de 2017;32:33–6.

53. Gou Z, Lu X. 184P Comparison of survival outcomes between repeat sentinel lymph node biopsy and axillary lymph node dissection among patients with ipsilateral breast tumor recurrence: A SEER population-based study. *Annals of Oncology*. setembro de 2022;33:5621.
53. Santos M. *Cancro da Mama: Avaliação do Gânglio Sentinela em Exame Extemporâneo*. Escola Superior de Saúde do Politécnico do Porto. Setembro de 2011;
55. Qiu SQ, Zhang GJ, Jansen L, De Vries J, Schröder CP, De Vries EGE, et al. Evolution in sentinel lymph node biopsy in breast cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. março de 2018;123:83–94.
56. Huxley N, Jones-Hughes T, Coelho H, Snowsill T, Cooper C, Meng Y, et al. Assessment of cost-effectiveness: systematic review. Em: *A systematic review and economic evaluation of intraoperative tests [RD-100i one-step nucleic acid amplification (OSNA) system and Metasin test] for detecting sentinel lymph node metastases in breast cancer [Internet]*. NIHR Journals Library; 2015 [citado 24 de setembro de 2024]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK269048/>
57. Tinterri C, Gentile D, Gatzemeier W, Sagona A, Barbieri E, Testori A, et al. Preservation of Axillary Lymph Nodes Compared with Complete Dissection in T1–2 Breast Cancer Patients Presenting One or Two Metastatic Sentinel Lymph Nodes: The SINODAR-ONE Multicenter Randomized Clinical Trial. *Ann Surg Oncol*. setembro de 2022;29(9):5732–44.
58. Saruta Y, Puig-Junoy J. Cost and Budget Impact Analysis of an Accurate Intraoperative Sentinel Lymph Node Diagnosis for Breast Cancer Metastasis. *Appl Health Econ Health Policy*. junho de 2016;14(3):323–35.
58. Sysmex Corporation. *Guia de formação OSNA Analisador RD-210 versão 3.0*. Julho de 2020
59. Sysmex Corporation. *Procedimento de ensaio OSNA*. Junho de 2022
61. Gante I, Ribeiro JM, Mendes J, Gomes A, Almeida V, Regateiro FS, et al. One Step Nucleic Acid Amplification (OSNA) Lysate Samples Are Suitable to Establish a Transcriptional Metastatic Signature in Patients with Early Stage Hormone Receptors-Positive Breast Cancer. *Cancers*. janeiro de 2022;14(23):5855.
62. 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*. 12 de julho de 2022;14(14):3384.
63. Vieites B, López-García MÁ, Martín-Salvago MD, Ramirez-Tortosa CL, Rezola R, Sancho M, et al. Predictive and prognostic value of total tumor load in sentinel lymph nodes in breast cancer patients after neoadjuvant treatment using one-step nucleic acid amplification: the NEOVATTTL study. *Clin Transl Oncol*. julho de 2021;23(7):1377–85.
64. Bernet L, Hardisson D, Rodrigo M, Córdoba A, Sancho M, Peg V, et al. OSNA Total Tumor Load for the Prediction of Axillary Involvement in Breast Cancer Patients: Should We use

Different Thresholds According to the Intrinsic Molecular Subtype? MOTTO Study. Clin Med Insights Pathol. janeiro de 2023;16:2632010X231183693.

65. Deambrogio C, Castellano I, Paganotti A, Zorini EO, Corsi F, Bussone R, et al. A new clinical cut-off of cytokeratin 19 mRNA copy number in sentinel lymph node better identifies patients eligible for axillary lymph node dissection in breast cancer. Journal of Clinical Pathology. 1 de agosto de 2014;67(8):702–6.
66. Terrenato I, D'Alicandro V, Casini B, Perracchio L, Rollo F, De Salvo L, et al. A cut-off of 2150 cytokeratin 19 mRNA copy number in sentinel lymph node may be a powerful predictor of non-sentinel lymph node status in breast cancer patients. Schmitt F, editor. PLoS ONE. 10 de fevereiro de 2017;12(2):e0171517.
67. Giuliano AE, Ballman KV, 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. JAMA. 12 de setembro de 2017;318(10):918–26.
68. Gandhi A, Coles C, Makris A, Provenzano E, Goyal A, Maxwell AJ, et al. Axillary Surgery Following Neoadjuvant Chemotherapy – Multidisciplinary Guidance From the Association of Breast Surgery, Faculty of Clinical Oncology of the Royal College of Radiologists, UK Breast Cancer Group, National Coordinating Committee for Breast Pathology and British Society of Breast Radiology. Clinical Oncology. setembro de 2019;31(9):664–8.
69. Heilmann T, Mathiak M, Hofmann J, Mundhenke C, Van Mackelenbergh M, Alkatout I, et al. Intra-operative use of one-step nucleic acid amplification (OSNA) for detection of the tumor load of sentinel lymph nodes in breast cancer patients. J Cancer Res Clin Oncol. outubro de 2013;139(10):1649–55.
70. Van Haaren ERM, Poodt IGM, Spiekerman Van Weezenburg MA, Van Bastelaar J, Janssen A, De Vries B, et al. Impact of analysis of the sentinel lymph node by one-step nucleic acid amplification (OSNA) compared to conventional histopathology on axillary and systemic treatment: data from the Dutch nationwide cohort of breast cancer patients. Breast Cancer Res Treat. novembro de 2023;202(2):245–55.
71. Sagara Y, Ohi Y, Matsukata A, Yotsumoto D, Baba S, Tamada S, et al. Clinical application of the one-step nucleic acid amplification method to detect sentinel lymph node metastasis in breast cancer. Breast Cancer. abril de 2013;20(2):181–6.
72. Sansano I, Vieites B, Sancho De Salas M, García C, Amendoeira I, Bernet L, et al. Axillary staging based on molecular analysis: Results of the B-CLOSER-II study. Pathology – Research and Practice. novembro de 2020;216(11):153197.
73. Li K, Meng M, Zhang W, Li J, Wang Y, Zhou C. Diagnostic value of one-step nucleic acid amplification for sentinel lymph node metastasis in cytokeratin 19-positive tumors: evidence from bioinformatics and meta-analysis. Front Oncol. 8 de abril de 2024;14:1370709.
74. Bartels SAL, Donker M, Poncet C, Sauvé N, Straver ME, van de Velde CJH, et al. Radiotherapy or Surgery of the Axilla After a Positive Sentinel Node in Breast Cancer: 10-

- Year Results of the Randomized Controlled EORTC 10981-22023 AMAROS Trial. *J Clin Oncol.* 20 de abril de 2023;41(12):2159–65.
75. Sarhangi N, Hajjari S, Heydari SF, Ganjizadeh M, Rouhollah F, Hasanzad M. Breast cancer in the era of precision medicine. *Mol Biol Rep.* outubro de 2022;49(10):10023–37.
 76. Piñero-Madrona A, Ripoll-Orts F, Sánchez-Méndez JI, Chaves-Benito A, Gómez-de La Bárcena MR, Calatrava-Fons A, et al. External validation of a prognostic model based on total tumor load of sentinel lymph node for early breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* junho de 2020;181(2):339–45.
 77. Shimazu K, Miyake T, Okuno J, Naoi Y, Tanei T, Shimoda M, et al. One-step Nucleic Acid Amplification Can Identify Sentinel Node-negative Breast Cancer Patients With Excellent Prognosis. *Anticancer Res.* março de 2019;39(3):1447–54.

Anexos

Anexo I – Critérios pTNM segundo a 8ª edição do AJCC Cancer Staging Manual

	Categoria	Critérios segundo 8ª edição TNM (23)
pT	TX	Tumor primário não pode ser analisado
	T0	Sem evidencia de tumor primário
	Tis (CDIS)	Carcinoma Ductal <i>in situ</i>
	Tis (Paget)	Doença de Paget do mamilo NÃO associada a carcinoma invasivo e/ou <i>in situ</i> o parênquima mamário subjacente
	T1	Tumor ≤ 20 mm de maior eixo
	T1mi	Tumor ≤ 1 mm de maior eixo
	T1a	Tumor > 1 mm mas ≤ 5 mm de maior eixo
	T1b	Tumor > 5 mm mas ≤ 10 mm de maior eixo
	T1c	Tumor > 10 mm mas ≤ 20 mm de maior eixo
	T2	Tumor > 20 mm mas ≤ 50 mm de maior eixo
	T3	Tumor > 50 mm de maior eixo
	T4	Tumor de qualquer dimensão com extensão à parede do tronco e/ou pele.
	T4a	Extensão à parede do tronco
	T4b	Ulceração e/ou nódulos satélites macroscópicos e/ou edema (incluindo pele "casca de laranja")
	T4c	T4a e T4b estão ambos presentes
T4d	Carcinoma inflamatório	
pN ^a	NX	Gânglios linfáticos regionais não podem ser analisados
	N0	Não se identificam metástases nos gânglios linfáticos regionais ou apenas células tumorais isoladas
	N0(i+)	Apenas células tumorais isoladas em gânglios linfáticos regionais (clusters de células malignas não superiores a 0,2 mm)
	N0 (mol+)	Achados moleculares positivos por RT-PCR. Sem detecção de células tumorais isoladas
	N1	Micrometástases; ou metástases em 1-3 gânglios linfáticos axilares
	N1mi	Micrometástases (aproximadamente 200 células, maior que 0,2 mm mas nenhuma maior que 2 mm)
	N1a	Metástases em 1-3 gânglios linfáticos axilares, pelo menos uma maior que 2 mm
	N1b	Metástases em gânglios linfáticos mamários internos ipsilaterais, excluindo células tumorais isoladas
	N1c	N1a e N1b estão ambos presentes
	N2	Metástases em 4-9 gânglios linfáticos axilares; ou gânglios linfáticos mamários internos ipsilaterais positivos por imagiologia na falta de metástases linfáticas axilares
	N2a	Metástases em 4-9 gânglios linfáticos axilares, pelo menos uma área tumoral maior que 2 mm
	N2b	Metástases em gânglios linfáticos mamários internos detetados clinicamente com ou sem confirmação microscópica; com gânglios linfáticos axilares patologicamente negativos
	N3	Metástases em 10 ou mais gânglios linfáticos axilares ou infraclaviculares ou mamários internos ou mais de 3 gânglios linfáticos axilares com micro- ou macrometástases em biópsia de gânglio sentinela ou gânglios linfáticos supraclaviculares
	N3a	Metástases em 10 ou mais gânglios linfáticos axilares, pelo menos uma área tumoral maior que 2 mm ou metástases em gânglios linfáticos infraclaviculares
N3b	N1a ou N2a na presença de N2b; ou N2a na presença de N1b	
N3c	Metástases em gânglios linfáticos supraclaviculares ipsilaterais	
Abreviaturas: RT-PCR – Reverse Transcriptase–Polymerase Chain Reaction		
^a Os sufixos (sn) e (f) devem ser adicionados à categoria N para indicar a confirmação de metástase por biópsia de gânglio sentinela ou biópsia com agulha/core, respetivamente.		



Relação da carga tumoral total avaliada por OSNA em gânglios sentinela da mama e a existência de metástases nas respetivas linfadenectomias – um estudo multicêntrico

Protocolo de recolha de dados

TSDT Filipa Joia

filipaajoia@ulsar.min-saude.pt

Serviço de Anatomia Patológica

da Unidade Local de Saúde Arco Ribeirinho

Projeto de dissertação do Mestrado Em Técnicas Laboratoriais Em Biopatologia na vertente de Patologia Molecular

Introdução

Esta dissertação consiste num estudo observacional, retrospectivo e sem intervenção que aborda as neoplasias epiteliais mamárias malignas, propondo-se a estudar a relação da presença de macrometástase de carcinoma invasivo da mama em gânglios linfáticos analisados intraoperatoriamente por OSNA® com a existência de metástases na respetiva linfadenectomia axilar.

A população escolhida são pacientes do género feminino diagnosticadas com cancro de mama invasivo e submetidas a cirurgia com exame intraoperatório por OSNA®, cujo resultado tenha sido positivo para macrometástases usando o *cutoff* definido por Tsujimoto *et al.*, e que tenham efetuado linfadenectomia axilar, durante o período de 01 de janeiro de 2018 a 31 de dezembro de 2023 (6 anos).

Recolha de dados

Os dados necessários para este estudo estão presentes nos relatórios anátomo-patológicos de cada paciente em cada Instituição participante. Assim, cada Instituição elege um elemento que garantirá a elaboração do levantamento dos dados necessários através dos programas internos dos respetivos serviços, e a anonimização dos mesmos, por exemplo, eliminando a coluna identificativa do paciente (nome) do documento Excel gerado.

Se considerado mais proficiente, a investigadora principal pode assinar um termo de responsabilidade e recolher, pessoalmente, os dados por forma a não causar impacto no *workflow* do Serviço participante, garantindo que serão anonimizados no local.

Para gerar os mapas de dados, é aconselhada a utilização de filtros, que podem variar de programa para programa, mas que representem amostras com topografia de mama (ex. C50) e gânglio linfático (ex. C77), bem como o tipo de exame se houver essa diferenciação no Serviço (ex. Tipo de Exame HB – Biópsias, HO – Peças Oncológicas, HE – Exame extemporâneo, etc.).

Assim, é possível que sejam gerados vários mapas ou apenas um com toda a informação, dependendo, uma vez mais do *software* utilizado.

Exemplos (simulados):

Mapa A – Exames extemporâneos de gânglios linfáticos com utilização de OSNA

Filtro (ANAPAT Glintt®):

- Tipo de exame: HE
- Topografia: C77 (ICD10)

DOENTE	NOME (eliminar esta coluna)	IDADE	SEXO	DESC_PRODUTO	MACROSCOPIA	DIAGNÓSTICO
123456	x	86	F	Biópsia de gânglio sentinela à esquerda.	Um gânglio linfático com 22mm e 1920mg	Macrometástase (6,18E+04 cópias)
789101	x	62	F	Biópsia de gânglio sentinela à direita.	Dois gânglios linfáticos com 5mm e 90mg e 13 mm e 200mg.	Um gânglio negativo e outro com macrometástases (7,2E+04 cópias)

Mapa B – Biópsias mamárias com tumor

Filtro (ANAPAT Glintt®):

- Tipo de exame: HB
- Topografia: C50 (ICD10)
- SNOMED: M8500/3

DOENTE	NOME (eliminar esta coluna)	IDADE	SEXO	DESC_PRODUTO	MACROSCOPIA	DIAGNÓSTICO
123456	x	86	F	Biópsia mamária à esquerda.	Cinco fragmentos cilíndricos brancos e amarelos com 7 mm a 12 mm de comprimento por 1 mm de diâmetro.	Carcinoma invasivo de tipo não especial G2 R. Estrogénios: 100%. R. Progesterona: 75%. HER2 (IHQ): INCONCLUSIVO (2+). Ki-67: 8%. CK19 (pré OSNA): positiva.
789101	x	62	F	Biópsia mamária à direita.	Quatro fragmentos cilíndricos brancos e amarelos com 9 mm a 15 mm de comprimento por 1 mm de diâmetro.	Carcinoma lobular invasivo ... R. Estrogénios: 100%. R. Progesterona: 100%. HER2 (IHQ): 1+ Ki-67: >30%. CK19 (pré OSNA): positiva.

Mapa C – Tumorectomia mamária e linfadenectomia

Filtro (ANAPAT Glintt®):

- Tipo de exame: HE
- Topografia: C50 e C77 (ICD10)
- SNOMED: M8500/3

DOENTE	NOME (eliminar esta coluna)	IDADE	SEXO	DESC_PRODUTO	MACROSCOPIA	DIAGNÓSTICO
123456	x	86	F	A – Tumorectomia da mama esquerda. B – Linfadenectomia axilar esquerda	A – Tumorectomia da mama esquerda, orientada com fios de sutura três eixos e que mede 45 mm x 50 mm x 35 mm. Tumor com 17 mm de maior eixo, que dista das margens cirúrgicas: Posterior: 10 mm Anterior: 14 mm Superior: 20 mm Inferior: 4 mm Externa: 10 mm Interna: 10 mm B – Peça de linfadenectomia axilar com 80 mm x 80 mm x 20 mm, na qual se isolam 13 gânglios linfáticos com dimensões compreendidas entre 2 mm e 20 mm.	Carcinoma invasivo de tipo não especial , bem diferenciado e com 17 mm de maior eixo. Na periferia da lesão identificam-se escassos focos de carcinoma intraductal de baixo grau e intermédio, de padrões sólido e cribriforme, sem necrose. Identificam-se invasões linfovasculares e perineurais. 13 gânglios linfáticos sem metástases. Margens livres de neoplasia. TNM (8ª Ed.): pT1c pN1a(sn) G1 LV12 PNI R0.
789101	x	62	F	A – Tumorectomia da mama direita. B – Linfadenectomia axilar direita	A – Tumorectomia da mama direita, orientada com fios de sutura três eixos e que mede 50 mm x 51 mm x 25 mm. Tumor com 18 mm de maior eixo, que dista das margens cirúrgicas: Posterior: 9 mm Anterior: 13 mm Superior: 20 mm Inferior: 4 mm Externa: 10 mm Interna: 11 mm B – Peça de linfadenectomia axilar com 60 mm x 70 mm x 20 mm, na qual se isolam 7 gânglios linfáticos com dimensões compreendidas entre 2 mm e 11 mm.	Carcinoma lobular invasivo , ... 7 gânglios linfáticos, 1 com metástases. ... TNM (8ª Ed.): pT1c pN1 G1 LV10 PNI R0.

Em alguns Serviços será necessário recorrer aos relatórios do equipamento OSNA® para registar o número exato de cópias de mRNA da CK19.

Alguns programas informáticos permitem recolher a informação toda em Excel outros omitem alguns parâmetros essenciais.

Sugere-se que se mantenha um parâmetro identificativo ao Serviço, porém não à investigadora deste projeto, como por exemplo, o número de processo da paciente, de forma a permitir pesquisar entre mapas ou solicitar mais informação ao elemento de ligação do Serviço, se esta não estiver presente nos mapas recolhidos.

O objetivo é o preenchimento de uma tabela com os seguintes parâmetros (apenas para a pacientes com macrometástases (> 5000 cópias de mRNA da CK19 no OSNA®):

- Idade (recomendado)
- Recetores de Estrogénios: POS/NEG (recomendado)
- Recetores de Progesterona: POS/NEG (recomendado)
- Status HER2: 0, 1+, 2+ (HIS: POS/NEG), 3+ (recomendado)
- % KI67: Baixo ($\leq 5\%$), intermédio (6%–29%), Alto ($\geq 30\%$) (recomendado)
- Diagnóstico: tipo de tumor (Ex. Carcinoma Invasivo SOE) (recomendado)
- pT (recomendado)
- pN (recomendado)
- Grau de Nottingham (recomendado)
- LVI (Não obrigatório)
- R (Não obrigatório)
- Número de gânglios analisados por OSNA (**obrigatório**)
- Tamanho médio em mm (recomendado)
- Peso médio mg e/ou peso total mg (não obrigatório)
- Carga Tumoral total: soma do número de cópias de todos os gânglios positivos. (**obrigatório**)
- Número de gânglios na linfadenectomia (total/positivos) (**obrigatório**)

É altamente recomendado o preenchimento do maior número de campos uma vez que estes vão caracterizar a amostra do estudo e permitir uma análise estatística mais significativa.

Compreende-se que os diferentes Serviços de Anatomia Patológica tenham protocolos de resposta diferentes, nos parâmetros em que as *guidelines* em vigor não são explícitas.

Ao se tratar de um estudo retrospectivo, que abrange 6 anos, é reconhecida a atualização de processos e como tal a dificuldade em apresentar os dados completos nos exames mais antigos.

Critérios de inclusão e exclusão de pacientes

A população escolhida consiste em pacientes do género feminino diagnosticadas com cancro de mama invasivo e submetidas a cirurgia com exame intraoperatório por OSNA[®], cujo resultado tenha sido positivo para macrometástase usando o *cutoff* definido por Tsujimoto *et al.* e que tenham realizado linfadenectomia axilar; entre 01 de janeiro de 2018 e 31 de dezembro de 2023 (6 anos).

São excluídos pacientes do género masculino, pacientes com patologia mamária não invasiva, bilateral ou com resultados provenientes de amostras inibidas (exclusivo no equipamento RD-100i). São também excluídas as pacientes com resultados que apresentem células tumorais isoladas ou que não tenham sido submetidas a linfadenectomia axilar.

Dos casos reunidos apenas os que obtiveram resultados positivos para macrometástase serão caracterizados histológica e molecularmente, no entanto, considera-se importante para a discussão do trabalho, clarificar qual o número total de pacientes que são abrangidas por este estudo e quantas tiveram análise OSNA[®] negativa e positiva para micrometástases.

Resultados esperados

Após análise de vários artigos publicados sobre projetos com bases muito semelhantes ao que se propõe, pode-se especular que existirá uma relação entre as macrometástases presentes nos gânglios analisados por OSNA[®] e a existência de pelo menos um gânglio positivo na linfadenectomia axilar correspondente.

No entanto, é esperado que se encontrem casos em que a linfadenectomia axilar não apresenta invasão. Nestes casos é importante determinar qual o número de cópias de mRNA da CK19 que lhe é correspondente, de forma a aferir se o *cutoff* utilizado (>5000 cópias) está apropriado à generalidade dos casos, ou se pode ser adaptado consoante algum parâmetro diferenciador, com o objetivo de diminuir as linfadenectomias não necessárias.

Dotar o estudo de validade estatística é essencial e como tal é de realçar a necessidade e importância da participação das várias Instituições convidadas, por forma a garantir um número relevante de casos.