

PESQUISA IMUNOISTOQUÍMICA COM PANCITOQUERATINAS (AE1/AE3) DE METÁSTASES LINFONODAIS EM CADEIA LATERAL PÓS-TRATAMENTO NEOADJUVANTE DE CARCINOMA (CA) DO RETO EXTRAPERITONEAL LOCALMENTE AVANÇADO

RESUMO

Em CA do reto localmente avançados e tratados com terapia neoadjuvante, ainda há controvérsias quanto a necessidade de se realizar a linfadenectomia pélvica lateral (LPL). De acordo com trabalhos japoneses, a incidência de metástases em linfonodos (LN) das cadeias laterais pode alcançar de 15% a 20% nos tumores Dukes C. Além disso, metástases em cadeia lateral significam doença sistêmica, não mais passível de cura e sem indicação de cirurgia mais alargada. Com a análise imunoistoquímica associada às técnicas de múltiplas secções, tem sido possível diagnosticar metástases linfonodais ocultas em 9% a 54% dos casos histologicamente negativos à microscopia convencional com coloração por hematoxilina e eosina (H-E). Os objetivos do presente estudo foram verificar a frequência de LN peritumorais e de cadeia lateral positivos, em espécimes cirúrgicos de pacientes com CA do reto, através de microscopia convencional com H-E e pesquisa imunoistoquímica de pancitoqueratinas (AE1/AE3). Foi realizado estudo retrospectivo de 15 pacientes com CA de reto extraperitoneal localmente avançado, submetidos à retossigmoidectomia ou amputação abdominoperineal do reto, com LPL associada à terapia neoadjuvante (radio e quimioterapia pré-operatórias). Todos os LN dissecados foram analisados em

H-E e através de imunoistoquímica (AE1/AE3). Dos 15 pacientes estudados, 2 (13%) apresentavam metástases de CA em cadeia lateral identificadas ao H-E. A pesquisa com AE1/AE3 identificou metástases em mais 2 pacientes dos 13 restantes, um dos quais não apresentava neoplasia residual na peça cirúrgica. Apesar de casuística ainda pequena, defendemos a necessidade da LPL associada à pesquisa imunoistoquímica de metástases linfonodais em pacientes com CA do reto extraperitoneal localmente avançado.

INTRODUÇÃO

Cerca de 945 mil casos novos de casos novos de câncer colorretal são registrados anualmente no mundo. É a quarta causa mais comum de câncer no mundo e a segunda em países desenvolvidos. O prognóstico desse tipo de câncer pode ser considerado de moderado a bom, sendo o segundo tipo de câncer mais prevalente no mundo (depois do câncer de mama), com uma estimativa de 2,4 milhões de pessoas vivas diagnosticadas nos últimos cinco anos. A sobrevida média mundial estimada é de 44%.

Nos EUA, o câncer colorretal (CaCR) continua a ser a segunda causa de morte relacionada a câncer, mesmo levando-se em conta a quantidade de programas de investigação em grande escala e também a existência de programas educacionais para a sua detecção precoce. Sua sobrevida de cinco anos é 61% nos EUA, 41% na Europa e de cerca de 30% no Leste Europeu¹.

A conduta e a estimativa de sobrevida no CaCR advém da extensão da doença à ocasião do seu diagnóstico inicial. O envolvimento regional linfonodal indica o

estádio da doença, o prognóstico e o possível benefício com a utilização da quimioterapia adjuvante. Assim, a adequada linfadenectomia é fundamental para orientar o tratamento e para definir, então, o prognóstico destes pacientes. Ainda há controvérsias quanto ao número mínimo de linfonodos que devem ser dissecados nestes casos. Tem-se preconizado, atualmente, um número que varia de seis (06) a dezessete (17) linfonodos².

Muitos estudos têm sido feitos para se determinar o número ideal de LN que seriam necessários para se estadiar adequadamente o câncer colorretal¹⁻¹³. Alguns relatos sugerem que, em torno de seis (06) LN, são suficientes¹⁴ enquanto outros apontam serem necessários cerca de quinze (15) ou mais LN¹⁵. Maurel *et al*¹⁶ mostraram que o número de LN examinados está diretamente relacionado ao estágio da doença. Além disso, o tamanho dos LN dissecados parece também ter importância. LN menores de 5mm também devem ser adequadamente examinados^{17,18}.

Desde o trabalho original de Dukes tem sido enfatizada a importância do comprometimento metastático linfonodal¹⁹ para estimativa do risco de recidiva local (RL) no CaCR, que, sem dúvida, é maior quando há metástases linfonodais²⁰⁻²³. Bokey *et al*²⁴⁻²⁵ relataram RL de 2.5% para Dukes A, 6.5% para Dukes B, e 22.6% para Dukes C e concluíram ser o envolvimento linfonodal o mais importante fator preditivo para sua ocorrência.

Além da dissecação linfonodal adequada, ressalta-se atualmente a importância do tratamento radio-quimioterápico neoadjuvante na esterilização de linfonodos metastáticos. A terapia neoadjuvante associada à excisão total do mesorreto tem proporcionado os melhores resultados para o controle local do câncer do reto²⁶⁻²⁸.

A taxa de ocorrência de metástases linfonodais parece ter relação com a invasão em profundidade do tumor, e a resposta à terapia neoadjuvante. O risco da ocorrência de metástase em LN na ausência de tratamento neoadjuvante é de 0% a 12% para tumores T1, 12% a 28% para tumores T2 e 36% a 79% para os tumores T3/T4²⁹⁻³³.

Tendo em vista as limitações para a identificação de comprometimento metastático dos LN no CaCR, mesmo no estudo anátomo-patológico de espécimes ressecados, e levando-se em conta que esse diagnóstico pode indicar a quimioterapia adjuvante e assim proporcionar melhor possibilidade de controle da doença, algumas técnicas têm sido desenvolvidas para a detecção de metástases sub-microscópicas por métodos imunoistoquímicos. Isto permite o estadiamento mais preciso destes casos e, por conseguinte, melhor estimativa do seu prognóstico³⁴⁻³⁶.

OBJETIVOS

Verificar a frequência de metástases de adenocarcinoma para de LN peritumorais e de cadeia lateral em espécimes cirúrgicos de pacientes portadores de câncer do reto extraperitoneal, localmente avançado, submetidos a radioterapia e quimioterapia pré-operatórias, empregando-se a microscopia convencional com cortes seriados corados em hematoxilina e eosina (H-E) e a utilização de método imunoistoquímico com pancitoqueratina (AE1/AE3).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudados quinze (15) pacientes com câncer do reto extraperitoneal, localmente avançado, operados pelo Grupo de Coloproctologia, Disciplina de Moléstias do Aparelho Digestivo, do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Como técnica cirúrgica, foi realizada a amputação abdomino-perineal do reto ou a retossigmoidectomia anterior com reconstrução colorretal distal ou coloanal. Realizou-se a dissecação linfonodal completa tanto peritumoral como de cadeia lateral, uni ou bilateralmente.

Todos os pacientes foram submetidos a radioterapia pré-operatória com 4500 Cy, de forma fracionada em 20 aplicações (5 aplicações semanais, durante 4 semanas), associada a quimioterapia com 5-FU e Leucovorin (5 aplicações, no início do tratamento) e tratamento cirúrgico entre a quarta e quinta semana após o término da radioterapia.

Os espécimes cirúrgicos foram avaliados por patologista do Laboratório de Anatomia Patológica do Gastrocentro, com estadiamento patológico segundo TNM³⁷. Todos os linfonodos dissecados (do mesocólon e os enviados separadamente, inclusive os de cadeia lateral) foram submetidos a cortes seriados em hematoxilina e eosina (H-E) e a estudo imunoistoquímico com pancitoqueratinas (AE1/AE3, DAKO, diluição 1:50) para pesquisa de metástases.

Foram avaliados sinais de involução tumoral (completa ou parcial) através do exame clínico (toque retal), endoscópico e também pelo exame anátomo-patológico.

RESULTADOS

A amostra era composta por 15 pacientes, 9 do sexo masculino (60%) e 6 do sexo feminino (40%), todos com adenocarcinoma de reto extraperitoneal, localmente avançado, submetidos à radioterapia e quimioterapia pré-operatórias.

A idade média dos pacientes foi de 64,3 anos. Predominaram os adenocarcinomas moderadamente diferenciados (n=14; 93%) e houve um (01) único caso de carcinoma do tipo colóide.

Em 15 pacientes estudados, dissecaram-se 331 LN (média: 22 LN dissecados/paciente), dos quais 258 LN eram peritumorais (77,9%; média: 17,2 LN dissecados/paciente) e 73 não peritumorais (22%; média: 4,8 LN dissecados/paciente).

Dentre os linfonodos não-peitumorais dissecados, incluem-se os linfonodos para-ilíacos, de fossas obturadoras (direita e esquerda), pré-aórticos e intercavaoárticos.

Pela técnica de cortes seriados corados em H-E, detectaram-se metástases em 21 dos 258 LN peritumorais (8,1%) e em 4 dos LN não peritumorais (1%, sendo 2 para-ilíacos e 2 de fossa obturadora), correspondendo estes últimos a 2 dos 15 pacientes estudados.

Quando se utilizou a pesquisa imunoistoquímica com pancitoqueratinas (AE1/AE3), foram identificadas metástases em mais 2 LN de cadeia obturatória direita, correspondendo a 2 dos 13 pacientes, até então, com cadeia lateral livre de metástases pela técnica convencional do H-E. Um (01) destes pacientes, inclusive, apresentava involução tumoral completa do adenocarcinoma retal.

DISCUSSÃO

É bem conhecido que aproximadamente metade dos pacientes com CaCR irão morrer no prazo de cinco anos após a cirurgia, mesmo levando-se em conta todos os progressos verificados na técnica operatória e nos tratamentos neoadjuvantes e adjuvantes. A presença de metástase em linfonodos (LN) após cirurgia curativa é ainda um dos mais importantes fatores prognósticos nestas neoplasias⁷⁻⁸. A sobrevida em cinco anos para pacientes com disseminação linfática da doença no momento da cirurgia é em torno de 45% a 50%⁹. A sobrevida em 5 anos em pacientes sem metástases linfonodais, por sua vez, se aproxima de 75 a 90%. Quimioterapia adjuvante pode reduzir essa mortalidade em mais de 20% nesses pacientes de alto risco¹⁰. Cerca de 70 a 80% dos pacientes sem evidência de metástase em LN ao exame microscópico convencional são considerados curados após cinco anos de pós-operatório⁴. Infelizmente, 20% a 30% dos pacientes classificados como estágio I e II irão apresentar recidiva da neoplasia e evoluir a óbito em decorrência da doença dentro desses cinco anos. Esse fato demonstra a falta de precisão na avaliação atual por estádios que não é capaz de identificar, em alguns casos, a presença de metástases linfonodais⁹.

Os métodos convencionais para exame de metástases em LN de pacientes com CaCR têm se mostrado limitados principalmente devido a um número insuficiente de LN dissecados, à sua incompleta remoção cirúrgica ou ainda pela subamostragem realizada pelo patologista ao examinar a peça cirúrgica^{35,38,39}. Assim, quanto mais LN são identificados, maior será o número de pacientes com possibilidade de serem diagnosticados como pertencentes ao grupo de LN N(+). Cerca de 20% a 30% de

pacientes, inicialmente diagnosticados como LN negativos podem ser posteriormente classificados como tendo metástases linfonodais, quando se utilizam métodos de cortes seriados e imunoistoquímica na análise destes linfonodos^{38,39}.

Também não parece haver um consenso quanto ao número ideal de cortes histológicos (secções) a serem realizados nestes linfonodos dissecados. Poucas secções podem deixar passar pequenos nichos de células tumorais. Múltiplas secções, portanto, aumentam a chance de identificação tumoral, mas pode não ser procedimento prático, quando muitos LN são examinados. Com a análise imunoistoquímica associada às técnicas de múltiplas secções têm sido possível diagnosticar metástases linfonodais ocultas (micrometástases, MM) em 9% a 54% dos casos histologicamente negativos à microscopia convencional com coloração por H-E^{5,6,11,13,16-18}. Além disso, técnicas como PCR tem sido capazes de identificar um grupo de pacientes não identificados por nenhuma dessas outras técnicas acima descritas^{13,40}.

É, portanto, de fundamental importância, a realização de novos métodos, para identificação de metástases linfonodais nos casos de CaCR, tais como a multisseção e pesquisa imunoistoquímica de pancitoqueratinas (AE1/AE3), permitindo a indicação precisa de terapia adjuvante mais agressiva nos pacientes com linfonodos positivos, considerados de alto risco⁹.

CONCLUSÃO

A dissecação do maior número possível de linfonodos junto ao espécime cirúrgico, aliada a sua avaliação mais detalhada através de múltiplas secções e estudo

imunoistoquímico com AE1/AE3 parece aumentar acurácia na identificação de pacientes de alto risco, possíveis candidatos a terapia adjuvante mais agressiva.

Apesar de casuística ainda pequena, os autores defendem a necessidade da LPL associada à pesquisa imunoistoquímica de metástases linfonodais em pacientes com CA do reto extraperitoneal localmente avançado, já que metástases nesta cadeia foram identificadas mesmo após involução completa da neoplasia primária após quimio e radioterapia pré-operatórias. Isto demonstra que, nestes casos, mesmo com a terapia neoadjuvante, não parece ocorrer esterilização completa dos linfonodos em cadeia lateral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Skibber JM, Minsky BD, Hoff PM: Cancer of the colon. In: De-Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA. **Cancer: principles and practice of oncology**. 6th Ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2001. p.1216-1271.
2. Cecil TD, Sexton R, Moran BJ, Heald RJ. Total mesorectal excision results in low local recurrence rates in lymph node-positive rectal cancer. **Dis Colon Rectum**. 2004; 47:1145-1150.
3. Gumus M, Yumuk PF, Atalay G, Allustaogiu M, Macunluoglu B, Dane F, Caglar H, Sengoz M, Turhal S. What is the optimal number of lymph nodes to be dissected in colorectal cancer surgery. **Tumori**. 2005; 91:168-172.

4. Hernanz F, Revuelta S, Renondo C, Madrazo C, Castillo J, Gomez-Fleitas M: Colorectal adenocarcinoma: quality of the assessment of lymph node metastases. **Dis Colon Rectum**. 1994; 37: 373-377.
5. Tepper JE, O'Connell MJ, Niedzwiecki D, Hollis D, Compton C, Benson AB 3rd, Cummings B, Gunderson L, Macdonald JS, Mayer RJ. Impact of number of nodes retrieved on outcome in patients with rectal cancer. **J Clin Oncol**. 2001; 19:157-163.
6. Wong JH, Severino R, Honnebier MB, Tom P, Namiki TS. Number of nodes examined and staging accuracy in colorectal carcinoma. **J Clin Oncol**. 1999; 17: 2896-2900.
7. Phillips RK, Hittinger R, Blesovsky L, Fry JS, Fielding LP. Large bowel cancer: surgical pathology and its relation-ship to survival. **Br J Surg**. 1984; 71:604-10.
8. Fielding LP, Phillips RK, Fry JS, Hittinger R. Prediction of outcome after curative resection for large bowel cancer. **Lancet**. 1986; 2:904-7.
9. Kronberg U, Lopes-Kostner F, Soto G, Zùñiga A, Wistuba I, Miranda V, Pinto E, Viviani P, Marshall G. Detection of lymphatic micrometastases in patients with stages I and II colorectal câncer: impacto n five-year survival. **Dis Colon Rectum**. 2004; 47:1151-7.

10. Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in colon cancer. International Multicentre Pooled Analysis of Colon Cancer Trials (IMPACT) investigators. **Lancet**. 1995; 345:939-44.
11. Goldstein NS, Sanford W, Coffey M, Layfield LJ. Lymph node recovery from colorectal resection specimens removed for adenocarcinoma: trends over time and a recommendation for a minimum number of nodes to be recovered. **Am J Clin Pathol**. 1996; 106: 209-16.
12. Metz CE. Basic principles of ROC analysis. **Semin Nucl Med**. 1978;8: 283-98.
13. Cianchi F, Palomba A, Boddi V, Messerini L, Pucciani F, Perigli G, Bechi P, Cortesini C. Lymph node recovery from colorectal tumor specimens: recommendation for a minimum number of lymph nodes to be examined. **World J Surg**. 2002; 26: 384-89.
14. Fielding LP, Arsenault PA, Chapuis PH, Dent O, Gathright B, Hardcastle JD, Hermanek P, Jass JR, Newland RC. Clinico-pathological staging for colorectal cancer: an International Documentation System (IDS) and an International Comprehensive Anatomical Terminology (ICAT). **J Gastroenterol Hepatol**. 1991; 6:325-44.
15. Jessup JM, McGinnis LS, Steele GD, Menck HR, Winchester DP: The National Cancer Data Base report on colon cancer. **Cancer**. 1996; 78: 918-26.

16. Maurel J, Launoy G, Grosclaude P, Gignoux M, Arveux P, Mathieu-Daude H, Raverdy N, Faivre J. Lymph node harvest reporting in patients with carcinoma of the large bowel: a French population-based study. **Cancer**. 1998; 82: 1482-86.
17. Rodriguez-Bigas MA, Maamoun S, Weber TK, Penetrante R, Blumenson L, Petrelli N. Clinical significance of colorectal cancer: metastases in lymph nodes <5 mm in size. **Ann Surg Oncol**. 1996; 3:124-30.
18. Herrera-Ornelas L, Justiniano J, Castillo N, Petrelli N, Stulc J, Mittelman A. Metastases in small lymph nodes from colon cancer. **Arch Surg**. 1987; 122:1253-6.
19. Dukes CE. The classification of cancer of the rectum. **J Pathol**. 1932; 35:323-32.
20. Rich T, Gunderson LL, Lew R, Galdibini JJ, Cohen AM, Donaldson G. Patterns of recurrence of rectal cancer after potentially curative surgery. **Cancer**. 1983; 52:1317-29.
21. Pilipshen SJ, Heilweil M, Quan SH, Sternberg SS, Enker WE. Patterns of pelvic recurrence following definitive resections of rectal cancer. **Cancer**. 1984; 53:1354-62.
22. Manfredi S, Benhamiche AM, Meny B, Cheynel N, Rat P, Faivre J. Population based study of factors influencing occurrence and prognosis of local recurrence

- after surgery for rectal cancer. **Br J Surg.** 2001; 88:1221-7.
23. Gunderson LL, Sosin H, Levitt S. Extrapelvic colon areas of failure in a reoperation series: implications for adjuvant therapy. **Int J Radiat Oncol Biol Phys.** 1985; 11:731-41.
24. Bokey EL, Ojerskog B, Chapuis PH, Dent OF, Newland RC, Sinclair G. Local recurrence after curative excision of the rectum for cancer without adjuvant therapy: role of total anatomical dissection. **Br J Surg.** 1999; 86:1164-70.
25. McCall JL, Cox MR, Wattoo DA. Analysis of local recurrence rates after surgery alone for rectal cancer. **Int J Colorectal Dis.** 1995; 10:126-32.
26. Enker WE. Designing the Optimal Surgery for Rectal Carcinoma. **Cancer.** 1996; 78:1847-50.
27. Cecil T.D, Sexton R, Moran BJ, Heald RJ. Total mesorectal excision results in low local recurrence rates in lymph node-positive rectal cancer. **Dis Colon Rectum.** 2004; 47:1145-49.
28. Takahashi T, Ueno M, Azekura K, Ohata H. Lateral node dissection and total mesorectal excision for rectal cancer. **Dis Colon Rectum.** 2000; 43(Suppl): S59-68.

29. Brodsky JT, Richard GK, Cohen AM, Minsky BD. Variables correlated with the risk of lymph node metastasis in early rectal cancer. **Cancer**. 1992; 69:322-6.
30. Morson BC. Factors influencing the prognosis of early cancer of the rectum. **Proc R Soc Med**. 1966; 59:607-8.
31. Sitzler PJ, Seow-Choen F, Ho YH, Leong AP. Lymph node involvement and tumor depth in rectal cancers: an analysis of 805 patients. **Dis Colon Cancer**. 1997; 40:1472-6.
32. Wichmann MW, Muller C, Meyer G, Strauss T, Hornung HM, Lau-Werner U, Angele MK, Schildberg FW. Effect of preoperative radiochemotherapy on lymph node retrieval after resection of rectal cancer. **Arch Surg**. 2002; 137:206-10.
33. Janjan NA, Khoo VS, Abbruzzese J, Pazdur R, Dubrow R, Cleary KR, Allen PK, Lynch PM, Guber G, Wolff R, Rich TA, Skibber J. Tumor down-staging and sphincter preservation with preoperative chemoradiation in locally advanced rectal cancer: the M. D. Anderson Cancer Center experience. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**. 1999; 44:1027-38.
34. Haboubi NY, Abdalla SA, Amini S, Clark P, Dougal M, Dube A, Schofield P. The novel combination of fat clearance and immunohistochemistry improves prediction of the outcome of patients with colorectal carcinomas: a preliminary study. **Int J Colorectal Dis**. 1998; 13:99-102.

35. Liefers GJ, Cleton-Jansen AM, van de Velde CJ, Hermans J, van Krieken JH, Cornelisse CJ, Tollenaar RA. Micrometastases and survival in stage II colorectal cancer. **N Engl J Med.** 1998; 339:223-8.
36. Esser S, Reilly T, Riley LB, Eyvazzadeh C, Arcona S. The role of sentinel lymph node mapping in staging of colon and rectal cancer. **Dis Colon Rectum.** 2001; 44:850-856.
37. Sobin LH, Wittekind Ch. Colon and rectum. In: Sobin LH, Wittekind Ch. TNM Classification of Malignant Tumours, 6th Ed. New York: Wiley-Liss;. 2002. p.72-6.
38. Koren R, Siegal A, Klein B, Halpern M, Kyzer S, Veltman V, Gal R. Lymph node-revealing solution: simple new method for detecting minute lymph nodes in colon carcinoma. **Dis Colon Rectum.** 1997; 40:407-10.
39. Scott KW, Grace RH. Detection of lymph node metastases in colorectal carcinoma before and after fat clearance. **Br J Surg.** 1989; 76:1165-7.
40. Mori M, Mimori K, Ueo H, Tsuji K, Shiraishi T, Barnard GF, Sugimachi K, Akiyoshi T. Clinical significance of molecular detection of carcinoma cells in lymph nodes and peripheral blood by reverse transcription-polymerase chain reaction in patients with gastrointestinal or breast carcinomas. **J Clin Oncol.** 1998; 16:128-32.