

HOSPITAL SÃO LUCAS DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA
DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
INSTITUTO DE PESQUISAS BIOMÉDICAS
Doutorado em Clínica Médica

Alessandra Menezes Morelle

DETECÇÃO DE MAMAGLOBINA (HMAM) E ANTÍGENO
CARCINOEMBRIÔNICO (CEA) POR RT-PCR EM LINFONODO, SANGUE
PERIFÉRICO E MEDULA ÓSSEA DE MULHERES SUBMETIDAS A
TRATAMENTO CIRÚRGICO DE CÂNCER DE MAMA

PORTO ALEGRE

2005

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

M841d Morelle, Alessandra Menezes
Detecção de mamaglobina (HMAM) e antígeno carcinoembriônico (CEA)
por RT-PCR em linfonodo,
sangue periférico e medula óssea de mulheres submetidas a tratamento
cirúrgico de câncer de mama /
Alessandra Menezes Morelle. – Porto Alegre, 2005.
66 f. : il.

Tese (Doutorado) - Fac. de Medicina, PUCRS, 2005.
Orientador: Prof. Dr. Bernardo Garicochea.

1. Medicina. 2. Câncer de Mama. 3. Micrometástases. 4. Mamaglobina.
5. Antígeno Carcinoembriônico. I. Título. II. Garicochea, Bernardo.

CDD 618.19

Bibliotecária Responsável: Deisi Hauenstein CRB-10/1479

ALESSANDRA MENEZES MORELLE

**DETECÇÃO DE MAMAGLOBINA (HMAM) E ANTÍGENO
CARCINOEMBRIÔNICO (CEA) POR RT-PCR EM LINFONODO, SANGUE
PERIFÉRICO E MEDULA ÓSSEA DE MULHERES SUBMETIDAS A
TRATAMENTO CIRÚRGICO DE CÂNCER DE MAMA**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Clínica Médica, pela Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Dr. Bernardo Garicochea

PORTO ALEGRE

2005

Algo é só impossível até que alguém duvide e
acabe provando o contrário.

Albert Einstein

Para minha filhinha Rafaella e meu marido
Jair. Pelos belos momentos que vivemos
juntos, pelo amor e carinho que recebo de
vocês, por darem sentido e alegria a minha
vida.

Para meus pais Valdir e Beatriz e minha irmã
Keka, pelos ensinamentos, pelo apoio e
incentivo aos meus projetos e sonhos, meu
eterno reconhecimento.

AGRADECIMENTOS

Meus Sinceros Agradecimentos:

Ao meu orientador, Dr. Bernardo Garicochea, por sua orientação e pela oportunidade de desenvolver o doutorado.

A equipe do Laboratório de Pesquisas Biomédicas da PUCRS: Silvana Lunardini Alves, Gabriela Devenz, Ana Cristina de Oliveira Dias pelas valiosas contribuições na realização deste estudo.

Às alunas Carolina Zank, Cecília Severo, Ana Elisa Andrighetti, Juliana Braga Eichenberg, Roberta Scalabrini Rodrigues, Carolina Menna Barreto Silveira, André Valiente Nectoux, pelo auxílio nas atividades de coleta de dados e de laboratório.

Aos Drs. Antonio Frasson e Felipe Zerwes pelo apoio na coleta de amostras durante as cirurgias da equipe de mastologia do HSL-PUCRS.

Ao Dr. Carlos Barrios pelo incentivo no meu desenvolvimento na área da pesquisa clínica, pelas valiosas contribuições na minha formação acadêmica.

Aos amigos Dra. Fernanda Costa e Dr. Alan Azambuja, pelo apoio e ajuda no decorrer destes anos.

Ao Dr. Mário Wagner pelas valiosas contribuições a este estudo.

Ao CNPQ pela bolsa de doutorado concedida e a FAPERGS, por terem viabilizado a realização deste estudo.

A todas as pacientes que participaram deste estudo, sem as quais ele não seria possível.

RESUMO

Racional: A apropriada indicação de terapia adjuvante no câncer de mama está atualmente embasada em fatores prognósticos clínico-patológicos. A busca de fatores mais precisos e confiáveis para a identificação de pacientes em que a indicação de tratamento complementar é imprescindível, é de grande importância nos dias atuais. A mamaglobina (hMAM) e o antígeno carcinoembrionário (CEA) têm sido alvos de estudos como marcadores de micrometástases de câncer de mama. O objetivo principal deste estudo foi avaliar a capacidade de detecção de micrometástases de câncer de mama pelo método de RT-PCR para hMAM e CEA. Métodos: Quarenta e nove pacientes com câncer de mama EC I a III, foram avaliadas no momento da cirurgia de mama com coleta de amostras de tecido mamário normal, tumor, linfonodo, sangue e medula óssea. Realizou-se RT-PCR para CEA e hMAM nos respectivos tecidos. Resultados: A maioria dos tumores expressaram CEA (37/ 44 casos) e hMAM (40/44 casos). Seis pacientes (27,3%) com histologia negativa nos linfonodos axilares expressaram CEA nos mesmos e 2 (8,7%) pacientes com esta situação expressaram hMAM nos linfonodos. Duas (5,7%) pacientes expressaram CEA no sangue e cinco (13,9%) expressaram hMAM. A medula óssea teve expressão de CEA em 3 (14,3%) pacientes e de hMAM em 5 (23,8%). Conclusão: A técnica de RT-PCR é capaz de detectar transcritos de CEA e hMAM em pacientes com câncer de mama. O significado clínico deste achado ainda deve ser esclarecido. A detecção em linfonodos para estes marcadores parece estar mais fortemente associada ao prognóstico que a detecção em sangue e medula óssea.

Palavras-chave: Câncer de Mama. Micrometástases. Marcadores Moleculares. RT-PCR. Mamaglobina. Antígeno Carcinoembrionário.

ABSTRACT

Background: The appropriate indication of adjuvant therapy in breast cancer is current embased on clinicalpathologic factors. The search of more specific and trustful factors for the identification of patients which adjuvant treatment is imperative has high importance nowadays. The mammaglobin (hMAM) and the carcinoembryonic antigen (CEA) have been targets for studies as markers of micrometastatic breast cancer disease. The purpose of this study was to evaluate the competence of micrometastatic breast cancer detection by RT-PCR for hMAM and CEA. **Methods:** Forty nine breast cancer patients clinical stage I to III were evaluated in the surgery moment with collect of samples of normal mammary tissue, tumor, lymph node, blood and bone marrow. We performed RT-PCR for hMAM and CEA in the respective tissues. **Results:** The majority of tumors expressed CEA (37/ 44 cases) and hMAM (40/44 cases). Six patients (27.3%) with negative hystopathologic exam for breast cancer metastasis, expressed CEA and 2 (8.7%) patients in the same situation expressed hMAM in the lymph nodes. Two patients (5.7%) expressed CEA in blood sample and five (13.9%) expressed hMAM. The bone marrow expressed CEA in 3 patients (14.3%) and hMAM in 5 patients (23.8%). **Conclusion:** The RT-PCR technic is able to detect transcripts of CEA and hMAM in breast cancer patients. The clinical significance of this must be elucidated. The detection of these markers in lymph nodes seems to be more strongly associated with the prognosis then the detection in blood and bone marrow.

Keywords: Breast Cancer. Micrometastasis. Molecular Markers. RT-PCR. Mammaglobin. Carcinoembryonic Antigen.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Reação da Cadeia de Polimerase – PCR	39
Figura 2	Controle Interno GAPDH	43
Figura 3	Resultado RT-PCR para CEA em Tumor (T), Mama (M), Linfonodo (L), Mix (X)	43
Figura 4	Resultado da RT-PCR para CEA (1) e hMAM (2) em amostra de mama (M), tumor (T) e linfonodo (L) da mesma paciente	44
Figura 5	Resultado da RT-PCR para hMAM e CEA em Mama (1), Tumor (2), Linfonodo (3), Sangue (4) e Medula óssea (5)	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição dos estágios clínicos na amostra de 49 pacientes	40
Tabela 2	Distribuição da Presença de hMAM e CEA em tecidos Tumorais das Pacientes Estudadas	41
Tabela 3	Correlação entre tamanho do tumor(T) e RT-PCR para os marcadores no tumor	45
Tabela 4	Correlação entre estadiamento axilar (N) e RT-PCR para os marcadores no tumor	45
Tabela 5	Correlação entre RT-PCR para os marcadores e o exame histopatológico de rotina dos linfonodos axilares	46
Tabela 6	Correlação entre RT-PCR para os marcadores no sangue e o estadiamento linfonodal	46
Tabela 7	Correlação entre RT-PCR para os marcadores na medula óssea e o estadiamento linfonodal	47
Tabela 8	Correlação entre RT-PCR para CEA no sangue e nos Linfonodos	47
Tabela 9	Correlação entre RT-PCR para mamaglobina no sangue e nos Linfonodos	48
Tabela 10	Correlação entre RT-PCR para CEA na medula óssea e nos linfonodos .	48
Tabela 11	Correlação entre RT-PCR para Mamaglobina na medula óssea e nos linfonodos	49

Tabela 12 Comparação entre diferentes tecidos quanto à expressão/positividade
de dois marcadores tumorais em 21 pacientes com câncer de mama 49

.....

LISTA DE ABREVIATURAS

μ l – microlitro

2E11 – Breast mucin antigen

A – Adenina

C – Citosina

CEA – Carcinoembryonic antigen

CK19 – cytokeratin 19

dATP – 2' deoxyadenosine 5' – triphosphate

dCTP – 2' deoxycytidine 5' - triphosphate

DEPC – Dietilpirocarbonato

dGTP – 2' deoxyguanosine 5' - triphosphate

DNA – Deoxyribonucleic acid

DPI I – Desmoplakin I

DR2 e D2102 – Identificação dos primers da mamaglobina

dTTP – 2' deoxythymidine 5' – triphosphate

EDTA – Ethylenediaminetetracetic acid

EGFR – Epidermal growth factor receptor

EGP 40 – Epithelial glycoprotein 40

EMA – Epithelial membrane antigen

erb2 e erb3 – Oncogenes

G – Guanina

GAPDH – Glyseraldehyde – 3 – phosphate dehydrogenase

HE – Hematoxilina Eosina

HER2 – Human epidermal growth factor receptor 2

HMFG – Human milk fat globule

MFGM – Milk fat globule membranes

mM – Micromolar (unidade de medida)

MUC 1 – mucin 1

n – nucleosídeo

NSABP – National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project

PCR – Polymerase chain reaction

pmoles – picomoles (unidade de concentração dos primers)

PSA – Prostate – specific antigen

PSM – Prostate – specific membrane antigen

RNA – Ribonucleic acid

RNA – Ribonucleic acid

RNA m – RNA mensageiro

RT-PCR – Reverse Transcription – polymerase chain reaction

T – Timina

U - Unidades

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.2	Estadiamento axilar	13
1.2.1	LINFONODO SENTINELA	15
1.2.2	MICROMETÁSTASES AXILARES	18
1.2.2.1	A Biologia das Micrometástases	19
1.2.2.2	Evidências da presença de doença micrometastática	21
1.2.2.3	Parâmetros de avaliação da doença micrometastática	22
1.2.2.3.1	<i>Novas metodologias de detecção de micrometástases</i>	27
1.2.2.3.2	<i>Mamaglobina e antígeno carcinoembrionico (CEA)</i>	31
1.2.2.4	Perspectivas no uso de marcadores moleculares	32
2	OBJETIVOS	34
2.1	Objetivo principal	34
2.2	Objetivos secundários	34
3	PACIENTES E MÉTODOS	35
3.1	Pacientes	35
3.2	Coleta das amostras	35
3.3	Isolamento e caracterização do RNA	36
3.4	Síntese de Cdna	37
3.5	PCR	37
4	RESULTADOS	40
4.1	Características das pacientes	40
4.2	Presença dos marcadores nos tecidos	41
4.2.1	CEA	42
4.2.2	HMAM	42
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
6	DISCUSSÃO	52
7	CONCLUSÕES	58
	REFERÊNCIAS	59

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama constitui uma doença de grande impacto na saúde pública mundial. É a primeira causa de morte por neoplasia em mulheres no Brasil e no Rio Grande do Sul. A estimativa do Instituto Nacional do Câncer para o ano de 2005 é de aproximadamente 49.470 novos casos de câncer de mama no país. O risco de uma mulher desenvolver câncer de mama ao longo de sua vida é de 1 para 8, ao passo que o risco de morrer por doença disseminada é de 1 em 30. Apesar dos grandes avanços no tratamento e no diagnóstico, a melhora no tempo de vida das pacientes com a doença tem sido pequena.

Sabemos que a morte pelo câncer de uma maneira geral e em especial pelo câncer de mama ocorre devido à disseminação das células neoplásicas em órgãos vitais como fígado, pulmões, cérebro. O implante das células neoplásicas em outros órgãos e tecidos é chamado de metástase. O primeiro sítio de metástase do câncer de mama são os linfonodos axilares. Isto porque a drenagem linfática da mama ocorre para os gânglios axilares. Uma vez que células tumorais metastatizam para linfonodos axilares, o prognóstico das pacientes muda de forma dramática. A sobrevida em 5 anos cai de 82% para 35% em pacientes com 1 a 3 linfonodos comprometidos. (1,2) Portanto, o conhecimento da presença ou ausência de células tumorais nos linfonodos axilares é fundamental no momento do diagnóstico para permitir avaliar o risco da paciente desenvolver metástases à distância, assim como o risco de morte pela doença. A avaliação dos linfonodos axilares quanto à presença de doença metastática é chamada de estadiamento linfonodal.

A partir deste conhecimento é que se desenvolveu o tratamento após a cirurgia, chamado de adjuvante. O objetivo do tratamento adjuvante é reduzir o risco de recidiva e morte pela doença através da erradicação de micrometástases. Portanto, o tratamento adjuvante não é profilático, mas sim terapêutico para a doença subclínica. Este tratamento adjuvante compreende esquemas de quimioterapia, hormonioterapia e radioterapia. A escolha

destes tratamentos é, atualmente, embasada em fatores prognósticos clínico-patológicos, como o estadiamento linfonodal, o tamanho do tumor, a presença de receptores hormonais nas células neoplásicas, a presença de invasão linfovascular, entre outros. A busca de fatores mais precisos e confiáveis para a identificação de pacientes em que a indicação de tratamento complementar é imprescindível ou que o tratamento adjuvante é dispensável, é de grande importância nos dias atuais.

Uma das linhas de investigação destes fatores tem sido realizada com o auxílio das técnicas de biologia molecular, principalmente para a pesquisa de doença metastática ainda não identificada pelos exames, atualmente, utilizados na rotina. O interesse nestes métodos se dá em especial, pelo potencial de sensibilidade e identificação precoce da doença.

1.2 Estadiamento axilar

A dissecação dos linfonodos axilares é o procedimento utilizado para o estadiamento de pacientes com câncer de mama. Esta dissecação é, geralmente, realizada no momento do tratamento cirúrgico da mama. A seguir, o patologista examina cada linfonodo a fim de identificar doença neoplásica metastática. Isto ocorre porque o exame clínico da axila é notoriamente de acurácia insuficiente. Aproximadamente 30% das pacientes com linfonodos axilares palpáveis não apresentam doença, seguindo-se à dissecação cirúrgica e em torno de 30% das pacientes negativas à inspeção clínica, apresentam envolvimento linfonodal. (3) O estadiamento linfonodal é o fator prognóstico independente mais importante no câncer de mama primário. (4) Pacientes com linfonodos axilares com doença metastática têm pior prognóstico que pacientes sem envolvimento neoplásico nos gânglios axilares. Entretanto, o

estadiamento linfonodal não é fator preditivo de resposta ao tratamento, ou seja, ele não nos informa quais pacientes irão responder ao tratamento ou não. (5) Uma metanálise de estudos randomizados demonstrou que a quimioterapia adjuvante para o câncer de mama proporciona uma redução relativa de risco de recidiva de aproximadamente 30%, com ganho absoluto de sobrevida global em dez anos de 7 a 11% em mulheres abaixo de 50 anos, e de 2 a 3% naquelas com mais de 50 anos. O benefício é observado em todos os subgrupos de pacientes, independentemente da idade, do estado menopausal, do comprometimento axilar e da presença de receptores hormonais no tumor. (6) Em geral, a terapia adjuvante sistêmica reduz o risco anual de recidiva e morte em aproximadamente 30 e 25%, respectivamente. (7) O benefício absoluto da terapia, entretanto, é geralmente maior em pacientes com gânglios positivos, porque estas pacientes apresentam um risco maior de recidiva e morte.

Ainda assim, o significado prognóstico do estadiamento linfonodal é pouco entendido. O pior prognóstico dos casos com doença na axila é freqüentemente atribuído ao retardo no diagnóstico. (8) Entretanto, o comprometimento nodal pode servir também como um marcador da biologia do tumor. As pacientes com doença axilar apresentam um fenótipo mais agressivo que as pacientes com linfonodos axilares normais.

Koscielny e Tuabiana argumentam que há uma continuidade entre os tumores de crescimento lento com envolvimento axilar tardio para tumores mais agressivos com metástases axilares precoces. (9) Um tumor de 1 cm com linfonodos axilares comprometidos pode ser cronologicamente precoce, mas biologicamente mais agressivo que um tumor de 2 cm, sem doença axilar. Esta hipótese implica que todos os tumores de mama eventualmente metastatizam para axila, com uma tendência para metástases precoces ou tardias, sendo este o fator de importância prognóstica. Certamente, estudos adicionais são necessários para elucidar o verdadeiro significado prognóstico das metástases nodais.

Com o surgimento do conceito de que o esvaziamento axilar tem mais valor prognóstico que terapêutico, tornou-se fundamental identificar quais pacientes seriam liberadas deste procedimento pela ausência de doença axilar. Outra justificativa para encontrar um método de pesquisa de doença axilar sem que se retirem todos os gânglios axilares, está na morbidade deste procedimento. Em geral as pacientes que realizam esvaziamento axilar apresentam-se com limitações funcionais no membro superior, além do risco de dor e edema crônico.

1.2.1 LINFONODO SENTINELA

A técnica de identificação do primeiro linfonodo para o qual é feita a drenagem do tumor foi descrita pela primeira vez por Cabanos em 1977, como uma forma de abordar pacientes com carcinoma de pênis que seriam beneficiados da dissecação inguino-fêmuro-iliaca. (10)

O linfonodo sentinela é o primeiro linfonodo a receber a drenagem linfática do tumor. Se o linfonodo sentinela está livre de metástases, supõe-se que todos os outros linfonodos devem estar livres de neoplasia. Da mesma forma, o envolvimento do linfonodo sentinela pode indicar que outros gânglios axilares possam estar envolvidos. O cirurgião identifica o primeiro linfonodo de drenagem do tumor por injeção de blue dye (azul patente) ou colóides radioativos intradérmicamente por volta do tumor primário. (11) Então, o gânglio é removido e encaminhado para avaliação histopatológica. Vários estudos têm mostrado que o linfonodo sentinela é realmente um fator preditivo do estado linfonodal. (12,13)

No futuro, a dissecação axilar poderá ser evitada em pacientes sem envolvimento metastático do linfonodo sentinela. Entretanto, primeiramente, é necessário que a eficácia do linfonodo sentinela seja testada em estudos prospectivos randomizados, antes que a dissecação axilar padrão seja abandonada. As contra-indicações absolutas do linfonodo sentinela devem incluir pacientes com linfonodos axilares metastáticos palpáveis, carcinomas multifocais e cirurgia prévia de axila ou mama, que possam interferir na drenagem linfática. (14)

A biópsia do linfonodo sentinela resulta numa avaliação histopatológica especialmente focada de um único linfonodo. A incidência de casos com envolvimento axilar é maior com a biópsia do linfonodo sentinela que no padrão de dissecação axilar. Giuliano et al. comparou 134 pacientes que realizaram dissecação axilar com 164 pacientes que fizeram biópsia do linfonodo sentinela seguida de dissecação completa. (15) Seguindo-se a dissecação axilar, 1 ou 2 cortes de cada linfonodo não sentinela foram examinados pela coloração de rotina com HE (hematoxilina e eosina). No grupo que realizou biópsia do linfonodo sentinela foi dada atenção particular ao mesmo, que foi avaliado por múltiplos cortes na coloração HE e imunohistoquímica para citoqueratina. A incidência de metástases linfonodais relatadas foi de 29% na dissecação axilar e avaliação histopatológica e 42% no grupo que realizou análise do linfonodo sentinela.

Assim, a avaliação do linfonodo sentinela através de múltiplos cortes e imunohistoquímica aumenta a eficiência do estadiamento axilar porque apresenta maior sensibilidade para detectar pacientes com micrometástases linfonodais. Entretanto, ainda não está definido se as pacientes que apresentam micrometástases linfonodais detectadas por estes métodos mais acurados, têm prognóstico pior.

Na biópsia do linfonodo sentinela, as conseqüências do índice de falsos-negativos também merecem consideração. (14) O índice de falsos-negativos é a porcentagem de pacientes com metástases linfonodais que seriam incorretamente designados como axila

negativa, se o linfonodo sentinela fosse utilizado. Um resultado falso-negativo pode levar a decisões incorretas com relação ao tratamento. Neste sentido, é crítico analisar corretamente o índice de falsos-negativos. O denominador correto é o número de pacientes com linfonodos positivos e não o número total de pacientes nas séries. Como exemplo, considerar 100 pacientes com câncer de mama, 60 com linfonodos axilares negativos para metástases e 40 com envolvimento nodal. Se houverem 4 falsos negativos nesta série, a taxa de falso-negativo deveria ser 4 de 40, ou 10%, e não 4 de 100. (14) Nem todos os estudos de biópsia do linfonodo sentinela publicados têm calculado corretamente o índice de falsos-negativos. Além disso, existe a preocupação com os efeitos que o linfonodo sentinela pode ter na recidiva local axilar e na mortalidade por câncer de mama. (14,16)

Teoricamente, o linfonodo sentinela negativo não requer dissecação axilar. Entretanto, os efeitos em longo prazo na sobrevida, recidiva local e morbidade na omissão do esvaziamento axilar em pacientes com linfonodo sentinela negativo não foram completamente elucidados.

Para verificar este comprometimento, o NSABP e o Comprehensive Cancer Center da Universidade de Vermont iniciaram um estudo em outubro de 1998. (16) As pacientes com linfonodo sentinela, patologicamente negativo, estão sendo randomizadas para permanecer somente na avaliação do sentinela ou para dissecação axilar completa. Este estudo irá comparar as taxas de sobrevida global, tempo livre de doença, controle local e morbidade nos 2 grupos. Trabalhos similares estão sendo realizados na Europa. (17,18)

Estes estudos prospectivos randomizados devem ser completados antes de se aceitar o linfonodo sentinela como padrão de conduta.

1.2.2 MICROMETÁSTASES AXILARES

Com o desenvolvimento da técnica do linfonodo sentinela e, conseqüentemente, o exame mais minucioso do mesmo, passou-se a identificar mais freqüentemente a presença de micrometástases. As implicações biológicas, assim como a definição da micrometástase, são muito discutidas atualmente na literatura. Geralmente, a micrometástase é definida como doença oculta menor ou igual a 2 mm de diâmetro. (19) O próprio termo micrometástase merece discussão. Inicialmente, os trabalhos utilizavam mais freqüentemente a terminologia doença residual mínima referindo-se a detecção de resíduos tumorais microscópicos ou submicroscópicos em vários tecidos. Infelizmente, a terminologia nesta área ainda não é padronizada. Por exemplo, os termos detecção de células tumorais, detecção de células isoladas, células micrometastáticas, células extrínsecas, são utilizadas como sinônimos. As micrometástases reais são grupos celulares organizados com capacidade de acesso ao sistema capilar. Células tumorais isoladas e disseminadas são precursoras das micrometástases. Entretanto, levando-se em consideração que o termo grego metastasis significa doença disseminada em um sentido amplo, o termo micrometasis significando disseminação celular também é justificado. Especialmente, por ser mais fácil e simples do que os outros termos sugeridos acima. (20) É neste sentido que utilizamos o termo micrometástase no presente estudo.

Apesar da recente identificação de múltiplos marcadores tumorais de pior prognóstico como o HER-2, o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e a expressão da catepsina D, a presença de metástases linfonodais permanece o mais importante indicador prognóstico e é o padrão ouro aos quais os futuros índices devem ser comparados.

1.2.2.1 A Biologia das Micrometástases

Estima-se que apesar da baixa velocidade de crescimento da maioria dos tumores de mama, a maior parte das metástases inicia-se precocemente quando o tumor primário é menor de 0,125 cm³ de volume, no momento em que desenvolve sua própria vascularização. (21) De todos os fatores que possam estar implicados no desenvolvimento de metástases à distância, parece que os fatores relacionados abaixo são os mais importantes para o desenvolvimento de micrometástases nos linfonodos (Quadro 1).

Invasão celular tumoral	Acesso aos vasos linfáticos
Adesão	Ligação aos linfonodos
Angiogênese	Desenvolvimento de neovascularização

Quadro 1 – Fatores Implicados no Desenvolvimento de Metástases à Distância

Devido a restrições da difusão de oxigênio e nutrientes, estima-se que a expansão da massa tumoral de 1 para 2 mm depende do desenvolvimento de um novo suporte sanguíneo. Uma vez que tenha ocorrido a metástase para linfonodos regionais, metástases secundárias podem ocorrer. Sítios secundários incluem metástases para linfonodos distantes como linfonodos supraclaviculares, assim como órgãos à distância, como fígado, pulmões, cérebro e ossos.

Assim, a presença de um foco metastático linfonodal sugere o potencial de disseminação do tumor para outros órgãos. O estado nodal parece mais um indicador de potencial para metástases distantes que uma barreira que sirva de impedimento para disseminação à distância. Por esta razão, a ressecção dos gânglios linfáticos, em geral, tem se mostrado com pouco impacto na sobrevida global. (22)

Diferente dos focos metastáticos estabelecidos, as células tumorais presentes na corrente circulatória não necessariamente constituem metástases, porque a maioria destas

células é eliminada rapidamente. Estima-se que menos de 0,1% das células tumorais que entram na circulação sanguínea sobrevivem mais de 24 horas e são capazes de formar focos metastáticos à distância. (23)

A sobrevivência de uma célula tumoral na circulação pelo tempo suficiente para implantar-se em um sítio à distância depende de um número de fatores, incluindo se as células tumorais serão capazes de interagir entre elas (via adesão homotípica) ou com outras células sanguíneas (via adesão heterotípica) para formar êmbolos que são mais protegidos do microambiente. (24)

Com o conhecimento de que o processo metastático é ineficiente, o significado das micrometástases detectadas tanto durante exames de rotina ou após rigorosa pesquisa de doença microscópica, deve ser questionado. Claramente, a presença de doença micrometastática sugere que mais de uma célula tumoral foi capaz de deixar o sítio primário e subsequentemente estabelecer um ambiente secundário em um órgão ou linfonodo distante.

Além de fatores individuais, a presença ou ausência de moléculas de superfície endotelial celular órgão-específicas que promovem metástases, parecem ser importantes. Recentes estudos também sugerem que o sistema imune do indivíduo tem um impacto significativo no potencial para qualquer célula tumoral metastatizar e proliferar. Acredita-se que as defesas imunes celulares são significativamente mais complexas do que eram previamente descritas. (25,26,27)

1.2.2.2 Evidências da presença de doença micrometastática

Três principais linhas de evidências sugerem que a doença nodal oculta pode existir e pode contribuir para a mortalidade das pacientes.

Primeiro, está claro que 20 a 30% das pacientes com linfonodos axilares histologicamente negativos irão morrer nos 5 anos do diagnóstico. (28,29,30)

Estes dados de sobrevida sugerem que a doença nodal oculta estava presente nestas pacientes afetadas e perdidas pela inspeção histológica de rotina ou havia invasão vascular direta com metástases sistêmicas, desviando inteiramente os linfonodos.

Em adição, existe uma clara correlação entre o tamanho do tumor e metástases nodais. Sabe-se que aproximadamente 27% das pacientes com tumores primários de 0,5 cm ou menos de diâmetro apresentam doença nodal. Estes dados simplesmente sugerem que as metástases nodais são um evento comum, até mesmo mais freqüente que atualmente evidenciado por técnicas patológicas padronizadas. (31)

O conceito de que doença nodal oculta existe é indiscutível, devido à grande quantidade de evidências sugerindo que a meticulosa reavaliação dos linfonodos classificados como negativos na revisão patológica inicial resulta em um estadiamento maior em numerosas pacientes.

Segundo, pacientes com axila negativa beneficiam-se de quimioterapia adjuvante. Muitos estudos têm estabelecido o benefício do tamoxifeno adjuvante ou quimioterapia em câncer de mama sem comprometimento axilar. (32,33) Atualmente, a quimioterapia pós-operatória é indicada no tratamento das pacientes com câncer de mama inicial (EC I e II), desde que o tumor tenha diâmetro maior que 1 cm ou exista comprometimento metastático de linfonodos axilares.

Uma possível conclusão destes dados é que a doença nodal oculta existe e se for detectada, irá apropriadamente estadiar acima um número de pacientes que seriam beneficiadas de quimioterapia adjuvante. Menos provável, é a possibilidade de que uma

significativa proporção de tumores metastatizam à distância sem metástases nodais e que estes tumores obtém benefício da quimioterapia adjuvante na população de câncer de mama sem metástases axilares.

Finalmente, a incidência de metástases em pacientes livres de envolvimento linfonodal (skip metástases) é baixa e, geralmente, relatada em menos de 5% dos casos. (34)

A ocorrência incomum de doença nodal em níveis mais altos que o nível 1 (linfonodos laterais ao músculo peitoral menor) sem doença sincrônica no nível I, sugere que é raro os tumores metastatizarem sem disseminação inicial para os linfáticos regionais. Uma notável exceção para esta tese diz respeito aos linfonodos mamários internos, que podem estar envolvidos com câncer metastático em 8,9% dos casos em que os linfonodos axilares são negativos e acima de 26% quando o tumor primário está na metade medial da mama. (35) A possibilidade que o câncer medial pode metastatizar à distância sem metástases para linfonodos axilares é real.

Entretanto, a simples conclusão de que a doença oculta existe não é suficiente. É necessário estabelecer métodos e parâmetros de sua identificação.

1.2.2.3 Parâmetros de avaliação da doença micrometastática

Numerosos estudos têm sido publicados com a proposta de determinar o significado das micrometástases no câncer de mama. Estes estudos geralmente têm reexaminado os linfonodos de pacientes ditas livres de envolvimento axilar por análises histopatológicas rotineiras.

Os linfonodos foram reestudados pelo uso de técnicas de séries de múltiplos cortes ou por imunohistoquímica para melhorar a sensibilidade da detecção. A doença identificada foi chamada de doença oculta e a presença da mesma foi correlacionada com as taxas de recidiva e sobrevida para estas pacientes e para pacientes reclassificadas como linfonodo negativas.

Apesar de nem toda doença oculta ser micrometastática, a maior parte da doença detectada nestas análises tinha menos de 2 mm de diâmetro. A fonte óbvia de erro deste tipo de estudo está relacionada à sensibilidade do método. Quanto maior o número de cortes reestudado, maior a chance de identificar uma micrometástase que tenha sido perdida. O uso da imunohistoquímica e, mais recentemente, da análise por PCR também pode significativamente melhorar as taxas de detecção.

O segundo tipo de estudo relatado envolve o uso da técnica qualificada por séries de cortes macroscópicos para procurar prospectivamente micrometástases, assim definidas pelo seu tamanho. Esta técnica não detecta doença oculta por si, entretanto é possível que sem o seu uso, casos com micrometástases passem despercebidos. Novamente, com esta técnica, quanto maior o número de cortes analisados, maior a chance de se detectar micrometástases. Além disso, pacientes avaliadas para micrometástases pela técnica de cortes macroscópicos parece testar uma hipótese diferente, quando comparamos os resultados com pacientes avaliadas por análises retrospectivas de cortes previamente classificados. Sem dúvida, a informação gerada destes estudos prospectivos é mais adequada e valiosa na determinação do significado de uma micrometástase solitária quando encontrada.

O terceiro tipo de estudo envolve a análise de pacientes com envolvimento axilar através de uma reclassificação da doença previamente detectada de acordo com o número de linfonodos metastáticos. Micrometástases foram arbitrariamente definidas pelo tamanho. O prognóstico de pacientes portadoras de micrometástases foi comparado com o prognóstico das pacientes previamente declaradas sem envolvimento nodal. Infelizmente, este tipo de

abordagem não é geralmente adequado para testar a importância das micrometástases. Isto porque o número de micrometástases e o número de linfonodos negativos são valores pouco acurados. Em adição aos três ou mais desenhos de estudos básicos, o estudo da literatura de doença micrometastática documenta numerosas variações que parecem ter levado a numerosos resultados quando 2 trials são comparados. Estas variáveis incluem:

- a) metodologia de seccionamento (intervalo entre os cortes, nº de cortes);
- b) metodologia de detecção (coloração HE, imunohistoquímica, PCR).

A definição de micrometástase é variável. Por exemplo, muitos autores têm sugerido que uma micrometástase é representada por um diâmetro de tumor menor que 2 mm, enquanto outros têm usado como ponto de corte menos de 0,5 mm. Finalmente, alguns autores têm definido micrometástases como somente aquelas que ocorrem no parênquima do linfonodo e outros têm incluído ambas metástases no sinus periférico e parênquima nas suas definições.

O maior estudo sobre o assunto realizado até o presente foi do International Ludwig Breast Cancer Study Group. (32,36) Este estudo envolveu a revisão de 921 pacientes com câncer de mama sem evidências de doença metastática distante e sem envolvimento axilar por estudos histopatológicos rotineiros. Todos os linfonodos foram resseccionados em 6 níveis com 6 cortes de 3 mm para cada nível, 2 dos quais eram corados por HE. Somente metástases no parênquima linfonodal foram interpretadas como micrometástases. Os cortes seriados identificaram depósitos micrometastáticos ocultos em 83(9%) das 921 pacientes. Destas 83 pacientes, 13 (15,6%) apresentaram depósitos em mais de 1 linfonodo. O efeito da doença micrometastática oculta prévia neste estudo foi claro. Em 5 e 6 anos de seguimento médio, a sobrevida livre de doença foi reduzida de 71% no grupo sem envolvimento axilar para 53% no grupo com envolvimento axilar ($p=0,0008$) e a sobrevida global foi reduzida de 86% no grupo sem envolvimento axilar para 70% no com envolvimento axilar ($p=0,0009$). Algumas

correlações interessantes foram observadas neste trial incluindo a associação significativa entre doença micrometastática oculta e tumores maiores, grau histológico, invasão vascular e idade abaixo de 50 anos.

O segundo maior estudo retrospectivo que reexaminou tecido nodal previamente classificado como negativo foi realizado por Hansworth et al. (37) Este estudo examinou o valor da imunohistoquímica em 343 pacientes com câncer de mama previamente classificadas como livres de metástases axilares. Usando anticorpos monoclonais antimucina, foram detectadas metástases ocultas em 41(12%) pacientes. A maioria das micrometástases ocultas eram menor que 2 mm de tamanho e todas foram confirmadas por HE, usando cortes seriados. Com uma média de 79 meses de seguimento, a presença de micrometástases ocultas em 2 ou mais linfonodos reduziu a sobrevida livre de doença de 84% para 54% ($p<0,01$) e sobrevida global de 85% para 70% ($p<0,01$). Este estudo e outro de Trojani et al. (38), demonstraram benefício da imunohistoquímica para detectar micrometástases, assim como o impacto negativo das micrometástases na sobrevida livre de doença e sobrevida global.

Apesar de tratar-se de estudos retrospectivos, os mesmos são informativos. Outra abordagem para esta questão tem sido a realização de análises prospectivas com intenção de identificar toda doença nodal oculta na revisão inicial. Em um estudo de Mascarel et al., 1680 pacientes foram submetidas ao método padrão de cortes nodais, chamada de cortes macroscópicos seriados. (39) Este método de cortes seriados é realizado para obter uma amostra de linfonodos de forma mais eficaz do que cortar cada linfonodo em fatias de 1,5 mm, cada uma das quais é examinada.

Neste estudo, as micrometástases foram definidas como lesões menores de 0,5 mm. Das 1680 pacientes, 336 foram identificadas como axila positiva, com 120 apresentando micrometástases únicas. Com um seguimento médio de 7 anos, tanto sobrevida livre de doença ($p=0,005$) e sobrevida global ($p=0,0369$) foram significativamente reduzidas no grupo

de pacientes com micrometástases. Em um estudo similar de Friedman et al., 1153 pacientes com câncer de mama foram analisadas prospectivamente com cortes macroscópicos seriados dos linfonodos. (40) Este estudo examinou o impacto da localização anatômica das micrometástases (parênquima vs. periférica). Destas pacientes, 637 (55%) eram livres de metástases axilares, enquanto 41 (3,5%) apresentaram um foco único no parênquima e 205 (18%) apresentaram foco de micrometástase periférica. Este estudo mostrou um risco relativo maior nas micrometástases encontradas tanto em parênquima (RR=1,7) como na periferia (RR=1,7) (p=0,05).

O uso rotineiro da biópsia do linfonodo sentinela parece ter aumentado significativamente a frequência de detecção das micrometástases. (41,42,43) Este aumento da detecção de metástases linfonodais de menor diâmetro é provavelmente relacionado ao processo de seleção operatório da biópsia do linfonodo sentinela. Antes do uso do linfonodo sentinela, as micrometástases eram aleatoriamente detectadas em espécimes de dissecação axilar linfonodal, com uma incidência baixa (8% dos casos). (44) O principal problema de muitos estudos prévios na tentativa de avaliar a incidência de micrometástases é que não se realizou uma pesquisa direcionada destas lesões. Além disso, micrometástases eram simplesmente definidas como qualquer lesão menor que um diâmetro especificado, e se identificadas em revisões de rotina, também eram rotuladas como tal. Em comparação, com o uso da biópsia do linfonodo sentinela, acredita-se que a incidência de detecção de micrometástases está se tornando mais frequente. (45) Em um recente estudo de Schreiber et al. (46) do H. Lee Moffitt Cancer Center and Research Institute, uma análise de 225 linfonodos sentinelas encontrou 21% dos linfonodos com envolvimento por doença micrometastática (menor que 2 mm), enquanto 6% apresentavam envolvimento por doença macrometastática. Com o uso rotineiro da imunohistoquímica para citoqueratina 19, detectou-

se doença micrometastática em 36% da amostra e 9% das pacientes foram reclassificadas para estágios maiores (estadiamento axilar negativo para positivo).

Estes estudos têm sugerido um impacto negativo da doença micrometastática. Entretanto, a real importância do câncer micrometastático no linfonodo sentinela permanece indeterminada pela falta de seguimento significativo. Por se tratarem de achados relativamente recentes, não houve tempo suficiente para comprovar se as pacientes com micrometástases identificadas são efetivamente de pior prognóstico em relação às verdadeiramente negativas. Além disso, a maioria dos estudos realizou análises retrospectivas e como já foi descrito, as formas de avaliação são diversas, o que dificulta a comparação dos resultados.

1.2.2.3.1 Novas metodologias de detecção de micrometástases

Devido a recentes avanços tecnológicos, a capacidade de incorporar metodologias patológicas sensíveis como a imunohistoquímica (46) e a RT-PCR (47) na análise de linfonodos está rapidamente tornando-se realidade. A pesquisa de micrometástases através destas técnicas em outros sítios, como sangue periférico e medula óssea também tem sido realizada. (48) Esta análise justifica-se já que os ossos são um dos principais sítios de metástases no câncer de mama. Sabe-se que quando as células neoplásicas infiltram o esqueleto, rompe-se o equilíbrio entre a formação e destruição dos ossos. As células neoplásicas infiltram primeiramente os sinusóides e após o espaço trabecular na medula. Neste ponto, necessitam de suporte sanguíneo para continuar crescendo. A base da relação entre as células neoplásicas e a medula parece ser feita por interações químicas. As células do

tumor secretam peptídeos relacionados ao hormônio da paratireóide, prostaglandina E e fatores de crescimento que estimulam a atividade dos osteoclastos e o crescimento do tumor. (48) Ainda não se sabe quais fatores que determinam o tempo da disseminação das células ao aparecimento das metástases clínicas. O significado biológico destes depósitos ocultos ainda precisa ser elucidado.

A imunohistoquímica tem sido a técnica mais utilizada para avaliação da medula óssea. O princípio da detecção de células tumorais por imunocitologia é baseado na detecção de estruturas celulares utilizando-se anticorpos que não apresentem reação a células mesenquimais. Apesar da lista de anticorpos já utilizados ser longa, duas famílias tem sido mais comumente utilizadas: anticorpos contra antígenos de superfície da membrana celular e anticorpos contra queratinas do citoesqueleto. Fazem parte da primeira família: EMA, CEA, 2E11, MFGM, HMFG, entre outros. Estes anticorpos geralmente reconhecem glicoproteínas ou glicolipídeos na superfície dos receptores. (20) Um inconveniente destes anticorpos é a possibilidade de falsos-positivos pela reatividade em células precursoras como eritroblastos e mieloblastos. (20) Os anticorpos anti-queratinas têm demonstrado elevada especificidade, mas também podem apresentar reatividade em situações benignas onde as citoqueratinas estão presentes. (20)

A reação da cadeia de polimerase-transcriptase reversa é o método mais sensível para detecção de doença micrometastática. Este método amplifica seqüências específicas de RNA, o que torna possível a detecção de células tumorais em pequena quantidade (1 célula tumor em 10^7 células normais). (46,49,50) Porém ainda não foram determinados quais marcadores são ideais para identificar células metastáticas, o que torna sua especificidade baixa. A amplificação do RNA mensageiro requer que o tecido de análise seja fresco ou congelado. A análise da medula óssea com RT-PCR para CK19, mostrou-se o método mais sensível para

detecção de micrometástases de câncer de mama. (48) Entretanto, foi demonstrado que 20% dos voluntários normais também apresentaram expressão de CK19.

Até o momento, poucos estudos especificamente direcionaram a análise por RT-PCR do linfonodo sentinela em pacientes com câncer de mama. A maioria dos estudos tem analisado linfonodos axilares não específicos ou analisam controles teciduais “normais” inapropriados. Além disso, ainda não foi identificado um marcador ideal para o câncer de mama através da RT-PCR (presente em todas as células tumorais de todas pacientes e sempre ausente em linfonodos normais). Em um estudo de Merrie et al., a expressão da citoqueratina (k) 8, k16, k19 e mupsina não mostraram-se marcadores úteis para detecção de doença micrometástática por terem sido encontradas na maioria dos controles normais testados. (51) No mesmo estudo, a expressão de mucina (MUC1) também se mostrou insensível e inespecífica.

Sete marcadores foram testados por RT-PCR para expressão em linhagens de adenocarcinoma de mama humana e em linfonodos normais de pacientes sem câncer, em um estudo de Min, Tafra e Verbanac (52) Dois marcadores apresentaram resultados excepcionais; a transcrição da mamaglobina e do antígeno carcinoembriônico foram detectadas em 100 e 71% dos adenocarcinomas, respectivamente, e foram ausentes em todos os linfonodos normais.

Neste método, a escolha do RNA alvo é crucial. Deve ser obviamente capaz de distingui-lo do RNA de células normais, ou pelo menos, não ser expresso em células normais nos tecidos que estão sendo testados para presença de células normais.

A técnica tem sido utilizada também para detectar micrometástases em outros sítios como o sangue periférico e a medula óssea. Zippelius et al. publicaram um estudo onde foram analisados aspirados de medula óssea de pacientes com câncer de próstata (n=53) e mama (n=10) que foram comparados com controles de pacientes sem câncer (n=53). (53) Oito

marcadores foram utilizados: glicoproteína epitelial-40 (EGP-40), desmoplaquina I (DPI I), antígeno carcinoembriônico (CEA), antígeno prostático específico (PSA), antígeno prostático específico de membrana (PSM), erb-B2, erb-B3 e citoqueratina 18 (CK18). Somente o PSA não foi detectado em nenhum dos controles normais. Este estudo concluiu que existem fatores limitantes para o uso da RT-PCR para detecção de micrometástases como a transcrição ilegítima de gens associados ao tumor ou gens epiteliais específicos das células hematopoiéticas. Outro fator limitante identificado foi à expressão deficiente dos marcadores em células tumorais micrometastáticas.

Slade et al., desenvolveu a técnica de RT-PCR quantitativa para detecção de micrometástases em sangue periférico e medula óssea. (54) O marcador utilizado foi a citoqueratina 19. O teste foi comparado com a imunohistoquímica, encontrando-se uma correlação favorável. Segundo os autores, a técnica quantitativa auxiliou a eliminar os casos falso-positivos. O estudo também demonstrou que a medula óssea apresenta-se mais positiva para micrometástases que o sangue periférico.

Em outro estudo, Mori et al., avaliou a significância clínica da detecção do CEA por RT-PCR em linfonodos e sangue periférico de 65 pacientes com câncer de mama ou câncer gastrointestinal e no sangue periférico de outros 102 pacientes. (55) Os pacientes foram acompanhados prospectivamente por 12 a 24 meses. Os autores também enfatizam a importância de evitarem-se resultados falso-positivos através da prevenção de contaminação das amostras. Apesar de existirem poucas informações sobre o valor prognóstico destes resultados, todos os pacientes que desenvolveram metástases após cirurgia curativa, possuíam positividade para CEA na técnica de RT-PCR. Da mesma forma nenhum dos pacientes com RT-PCR negativa para CEA, desenvolveu metástases no decorrer do seguimento.

1.2.2.3.2 Mamaglobina e antígeno carcinoembriônico (CEA)

Em 1996, um novo gene foi isolado e identificado como mamaglobina humana (hMAM). (56) A seqüência de aminoácidos da hMAM exhibe homologia com uma grande quantidade de proteínas secretadas pelo grupo de genes da família da uteroglobina. Sua função específica ainda não está identificada. O gene hMAM está localizado no cromossomo 11q13, uma região que é amplificada em uma grande quantidade de neoplasias mamárias. Até o quanto se pode afirmar no momento, a expressão da hMAM é restrita ao tecido da glândula mamária adulta e em linhagens tumorais de mama. Está superexpressa em aproximadamente 23% dos tumores de mama quando comparados ao tecido mamário normal. A análise por Northern Blot de 17 linhagens celulares diversas, incluindo amostras malignas, revelou a expressão de RNAm de hMAM somente nas amostras de câncer de mama. (56) Ainda, 16 amostras de tecidos humanos (incluindo mama, ovário, útero e leucócitos) testados para a pesquisa de RNAm de hMAM, por RT-PCR, demonstrou que as amostras positivas provinham somente do tecido mamário.

No estudo de Zach et al. Foi analisado 114 amostras de sangue periférico obtidos de pacientes com câncer de mama, nos diversos estágios clínicos. As amostras foram estudadas para pesquisa de hMAM através de RT-PCR. (57) O grupo de estudo era comparado com 68 amostras oriundas de pacientes sem neoplasia de mama, onde 27 eram ditas sadias. As demais (n = 41) apresentavam outras neoplasias. Nenhuma das pacientes sadias mostrou positividade para a pesquisa de hMAM, enquanto que 29 (25%) das pacientes com câncer de mama foram positivas para hMAM.

O antígeno carcinoembriônico foi originalmente descrito como uma glicoproteína com um padrão de expressão oncofetal. É um notável marcador tumoral de neoplasias do trato

gastrointestinal em especial, dos carcinomas gástricos e coloretais. Também está expresso na grande maioria dos tumores de mama. (54) Existem diversos estudos que descrevem o CEA como um marcador detectado por RT-PCR, que determinou células tumorais em linfonodos medula óssea e sangue periférico de pacientes com câncer de mama. (50,51,54)

1.2.2.4 Perspectivas no uso de marcadores moleculares

Diante destas evidências, podemos inferir que a técnica de RT-PCR para detecção de micrometástases tumorais poderá futuramente nos ser de grande auxílio na prática clínica para determinarmos com precisão aqueles pacientes de alto risco para metástases. Além disso, nos será útil também no acompanhamento e detecção precoce de possíveis recidivas.

Este assunto torna-se ainda mais crítico quando analisamos o grande número de mulheres que realizam quimioterapia adjuvante para câncer de mama e que poderiam ser dispensadas se tivéssemos meios mais exatos de identificar a completa ausência de doença oculta. Somado à identificação de doença oculta, os marcadores moleculares também poderão identificar tumores que sejam responsivos ou não a determinados esquemas quimioterápicos, auxiliando na decisão terapêutica do paciente.

A identificação destas moléculas é um dever que temos com a sociedade, onde os custos ligados à saúde são cada vez maiores.

Entretanto, ainda existem alguns desafios que devem ser transpostos, como a identificação de marcadores adequados para cada tipo de tumor, a padronização da técnica e a determinação da significância clínica destes achados.

Para tanto, desenvolvemos o presente estudo a fim de identificar em pacientes com câncer de mama que serão submetidas a tratamento cirúrgico, a presença de micrometástases em linfonodos axilares, medula óssea e sangue periférico através da técnica de RT-PCR para mamaglobina e antígeno carcinoembriônico.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

Detectar a presença de micrometástases de câncer de mama em linfonodos axilares, medula óssea e sangue periférico.

2.2 Objetivos secundários

- a) comparar a detecção de micrometástases em linfonodos, medula óssea e sangue periférico;
- b) verificar a possível relação das micrometástases com tamanho do tumor e receptores hormonais;
- c) comparar o resultado da técnica de RT-PCR com o método histológico padrão.

3 PACIENTES E MÉTODOS

3.1 Pacientes

Uma série de 49 pacientes com câncer de mama operável que foram submetidas a cirurgia no período de junho/2000 a janeiro/2004 foram selecionadas para coleta de tecido tumoral, linfonodo axilar, sangue periférico e medula óssea no momento do tratamento cirúrgico. As pacientes não possuíam diagnóstico prévio de carcinoma, não apresentavam metástases à distância e não receberam nenhum tratamento neoadjuvante. Todas as pacientes receberam e assinaram Termo de Consentimento Esclarecido.

3.2 Coleta das amostras

Antes do procedimento cirúrgico, coletou-se 5 ml de sangue periférico e 5 ml de aspirado de medula óssea de crista ilíaca. Ambos foram armazenados em frasco com EDTA e rapidamente enviados ao laboratório.

Na retirada do tumor da mama, antes de colocar a peça em formol, o patologista identificou a lesão e seccionou uma parte que foi imediatamente armazenada em nitrogênio líquido. O mesmo foi feito com uma parte de tecido normal de mama. No esvaziamento axilar, tão logo foi ressecado o primeiro nível, o patologista seccionou um dos gânglios na metade, que também foi imediatamente armazenado em nitrogênio líquido.

3.3 Isolamento e caracterização do RNA

Leucócitos provenientes de medula óssea ou sangue periférico e células oriundas do maceramento do linfonodo, tumor e tecido mamário, foram ressuspensos em 1 ml de reagente TRIZOL® (GIBCO – BRL LifeTechnologies, Inc., Gaithesburg, MD, USA) e incubados por 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 200µl de clorofórmio e a amostra foi centrifugada a 12.000g por 15 minutos a 4°C (HIMAC CRT15T Refrigerated Centrifuge, HITACHI). O “pellet” foi desprezado, sendo o sobrenadante precipitado com 500µl de isopropanol e mantido por 10 minutos em temperatura ambiente. Após este intervalo, a amostra foi novamente centrifugada a 12.000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o RNA precipitado (pellet) lavado com etanol a 70%, secado a vácuo e finalmente ressuspensão em 20µl de água tratada DEPC (GIBCO – BRL Life Technologies, Inc., Gaithesburg, MD, USA) para ser estocado a – 80°C até posterior processamento. A quantificação do RNA total extraído foi obtida por densitometria ótica (DO) a 260nm. Somente amostras com relação DO 260/280 maior que 1,8 nm foram utilizadas para o ensaio de proteção à ribonuclease e para RT-PCR. As amostras, foram submetidas à eletroforese a 100 V em tampão TAE 1X por 25 minutos. Foram utilizadas somente as amostras que se mostraram íntegras à análise sob luz de violeta.

3.4 Síntese de cDNA

Um micrograma de RNA total foi utilizado na síntese de DNA complementar. Foi feita a reação *Reverse Transcriptase Chain Reaction* utilizando SuperScript III Rnase H⁻ transcriptase reverse (GIBCO-BRL Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, USA). O volume total de 20µl compreendeu os seguintes reagentes: 1µg de RNA, 100 pmoles de hexanucleotídeos randômicos, 3 mM de MgCl₂, 5x tampão da enzima, 10mM de dithiothreitol, 100mM de cada um dos dideoxinucleosídeos, 200 unidades de SuperScript III e 5U de RNase OutTM Ribonuclease Inhibitor^(Recombinant) (GIBCO – BRL LifeTechnologies, Inc., Gaithersburg, MD, USA). A reação foi processada a 25°C por 10 minutos, 42°C por 45 minutos. 99°C por 3 minutos finalizando em 4°C.

3.5 PCR

A identificação dos transcritos de Mamaglobina e CEA foi feita através da técnica RT-PCR.

Os amplímetros utilizados na primeira reação de PCR foram os seguintes: Mamaglobina1, Mamaglobina 2, CEA1, CEA2. Estas seqüências identificam as bases DR2 (5' ATA AGAAAG AGA AGG TGT GG 3') e D2102 (5' CAG CGG CTT CCT TGA TCC TTG 3') ou GAPDH F1 (5' CCA CCC ATG GCA AAT TCC ATG GCA 3') e R1 (5'TCT AGACGG CAG GTC AGG TCC ACC 3') do gene da mamaglobina (n 997 – 3916) e as

seguintes identificam CEA sense (5' TGT CTC TAA CTTGGC TAC TGG 3') e CEA anti-sense (5' CAC GAT GTT GGC TAG GAT GGT 3') (n 2101 -2341)

A reação de PCR foi constituída de 5 µl de DNA complementar em uma solução com volume final de 25 µl, contendo 10 pmol de cada primer, 200 pmol de desoxinucleosídeos (dATP,dCTP, dGTP, dTTP), 1,5 mM de MgCl₂, 10x tampão da enzima, 2U Taq Polimerase e água deionizada e bidestilada autoclavada até completar o volume de 25 µl. O material foi submetido ao protocolo de amplificação constituído de: 46 ciclos a 95°C por 1 min, 61°C por 1 min e 72°C durante 5 min.

A reação de PCR foi realizada em termociclador automático (MJ Research PT150CA, USA). Todas as reações foram acompanhadas de uma Mix sem DNA, para excluir possibilidades de contaminação. O resultado da amplificação foi verificado por eletroforese em gel de Agarose a 2% e observado em transluminador ultravioleta (2011 Macrovue Transluminator LKB, Bromma, Sweden).

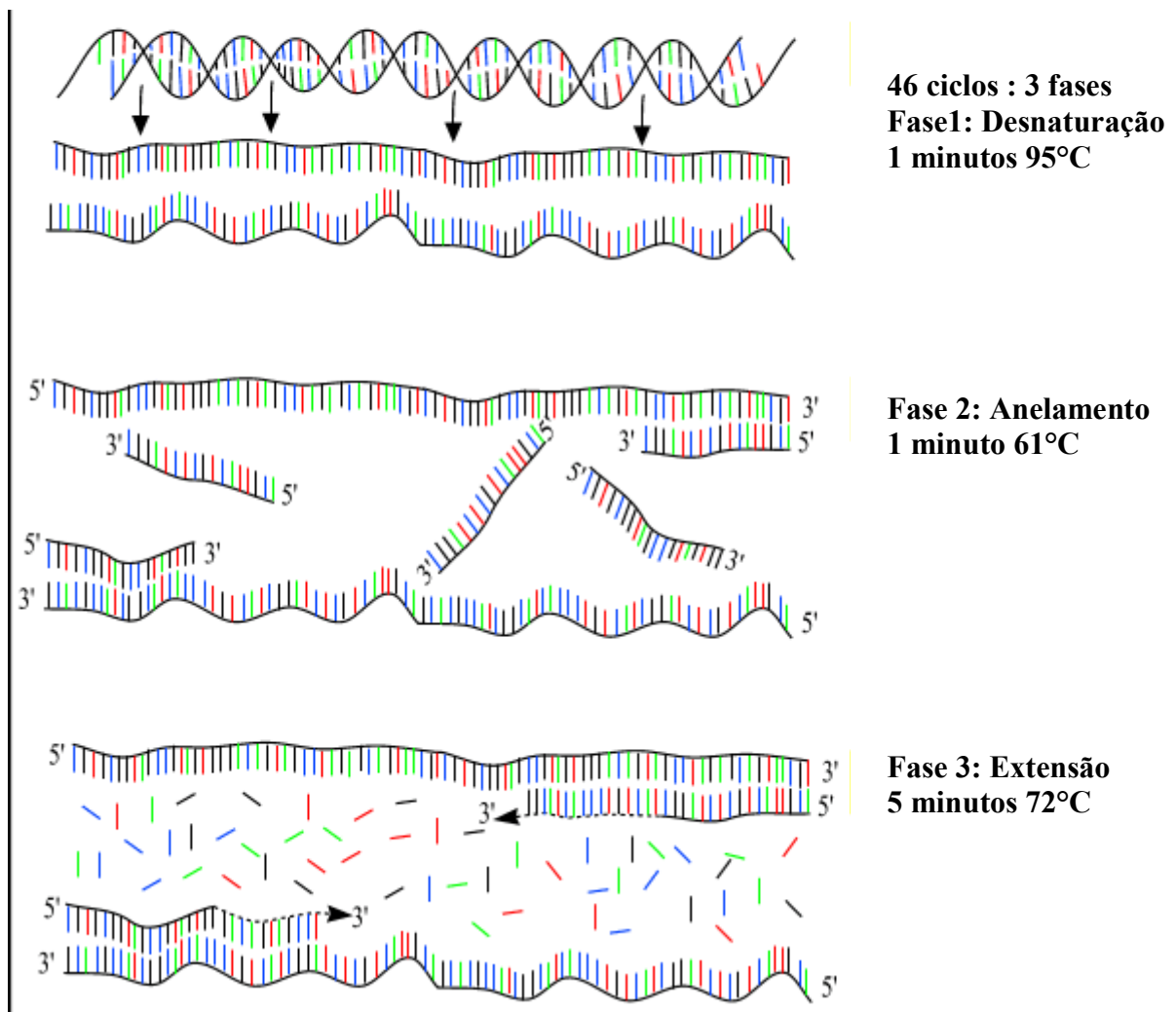


Figura 1 - Reação da Cadeia de Polimerase - PCR

Fonte: Andy Vierstraete (1999 citado por SOMMA, M.; QUERCI, M. **The analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms**: session 6: the polymerase chain reaction (POC). [S.l.]: European Comission, Joint Research Center, [200-]. Disponível em: <<http://gmotraining.jrc.it/docs/Session06.pdf>>. Acesso em: 10 maio 2005).

4 RESULTADOS

4.1 Características das pacientes

Um total de 49 pacientes entrou no estudo. Destas, 21 apresentaram todas as amostras teciduais viáveis para a análise estatística. Isto ocorreu porque algumas pacientes não aceitaram a biópsia de medula óssea no momento do consentimento esclarecido.

A idade variou de 27 anos e 82 anos – média de 53,5 anos. O carcinoma ductal invasor foi o tipo histológico mais freqüente, ocorrendo em 79,6% das pacientes. (39) O tamanho do tumor teve distribuição de 49% (24) para T1, 42,9% (21) para T2 e 8,2% (4) para T3. Pacientes com linfonodos negativos, na histologia, compreenderam 49% (24) dos casos, 28,6% (14) apresentaram 1 a 4 linfonodos positivos, 14,3% (7) apresentaram 5 a 10 linfonodos positivos e 8,2% (4) apresentaram mais de 10 linfonodos positivos.

Os estágios clínicos tiveram a seguinte distribuição:

Tabela 1 – Distribuição dos estágios clínicos na amostra de 49 pacientes

	Freqüência	Percentual
EC I	16	32,7
EC IIA	17	34,7
EC IIB	11	22,4
EC IIIA	5	10,2
Total	49	100,0

Fonte: Elaborada pela autora, com base na pesquisa.

A tabela acima mostra que mais da metade das pacientes apresentavam-se em estágios iniciais I e IIA (67,4%).

Receptores para estrogênio foram positivos em 77,6% (38) pacientes e progesterona 61,2%.
(30)

4.2 Presença dos marcadores nos tecidos

Quarenta e um casos tiveram positividade para um dos marcadores ou ambos, como mostra a tabela 2:

Tabela 2 - Distribuição da Presença de hMAM e CEA em tecidos Tumorais das Pacientes Estudadas

	hMAM Positivo	hMAM Negativo
CEA Positivo	36	1
CEA Negativo	4	3
Total	40	4

Fonte: Elaborada pela autora, com base na pesquisa.

Em cinco casos (10,2%) a amostra do tumor foi inconclusiva para a análise do CEA e hMAM, devido à presença de bandas inespecíficas na RT-PCR ou ausência de RNA na amostra.

4.2.1 CEA

Seis pacientes das 49 apresentaram expressão de CEA em mama normal (12,2%). Em cinco destas pacientes, o tumor também expressou CEA. Os tumores tiveram positividade para CEA em 77,6% (38) e os linfonodos foram positivos para este marcador em 36,7%. (15) Duas pacientes (4,1%) apresentaram expressão de CEA no sangue periférico e três (6,1%) apresentaram expressão em medula óssea. As duas pacientes que apresentaram expressão no sangue periférico estavam entre as 3 que apresentaram na medula óssea. Todas as pacientes que tiveram expressão em sangue periférico, medula óssea e linfonodos também possuíam este marcador no tecido tumoral, o que indica a legitimidade do CEA como marcador.

4.2.2 hMAM

A mamaglobina foi expressa em 79,6% (39) das amostras de tecido mamário normal e 85,7% (41) das amostras de tumor. Os linfonodos foram positivos para este marcador em 24,5% (12) dos casos e 10,2% (5) no sangue e medula óssea concomitante. Assim como ocorreu com o CEA, as pacientes com expressão de mamaglobina em sangue periférico, medula óssea e linfonodos também apresentaram expressão em tecido neoplásico.

Quando analisamos a combinação dos dois marcadores, duas pacientes apresentaram expressão de ambos marcadores em sangue e medula óssea.

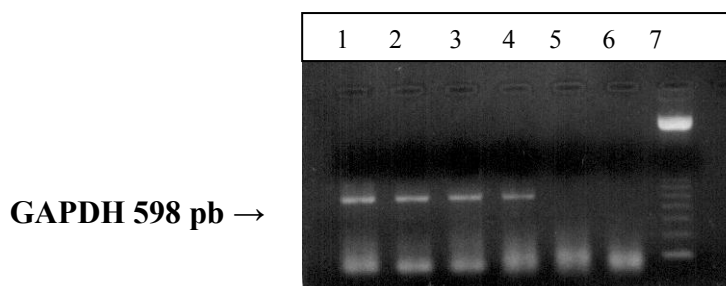


Figura 2 - Controle Interno GAPDH

O controle interno utilizado foi o GAPDH, que é o gene de uma enzima envolvida na glicólise presente em todas as células. A ausência de expressão do GAPDH demonstra ausência de RNA na amostra. Na figura 1 se observa a expressão de GAPDH em mama (1), tumor (2), linfonodo (3) e sangue (4). A amostra 5 e 6 são controles sem RNA e a 7 é o marcador com 123 pb.

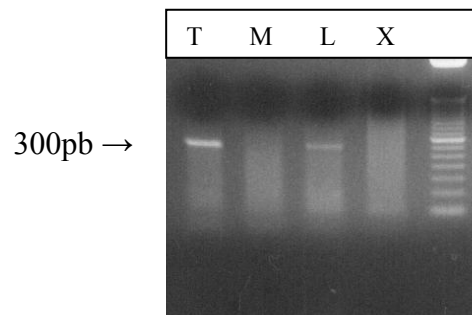


Figura 3 - Resultado RT-PCR para CEA em Tumor (T), Mama (M), Linfonodo (L), Mix (X)

Houve expressão de CEA em tumor e linfonodo, identificando-se no gel através da marca em 300 pares de bases. A Mix corresponde a “mistura” de todos os reagentes menos o DNA, a fim de comprovármos a ausência de contaminação no PCR.

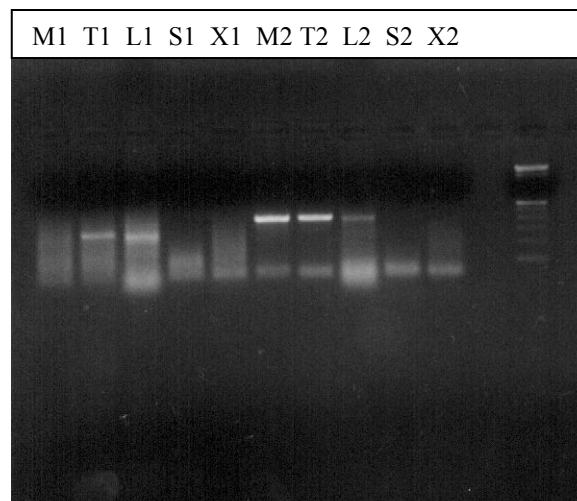


Figura 4 - Resultado da RT-PCR para CEA (1) e hMAM (2) em amostra de mama (M), tumor (T) e linfonodo (L) da mesma paciente

Os resultados M1 a X1 correspondem à expressão de CEA, que tem 300pb. S1 é o controle sem RNA e X1 a mix. Os resultados M2 a X2 correspondem a expressão de hMAM, que tem 429 pb. Igualmente, S2 é o controle sem RNA e X2 a mix. A figura demonstra que houve expressão de CEA em tumor e linfonodo e expressão de mamaglobina em mama, tumor e linfonodo.

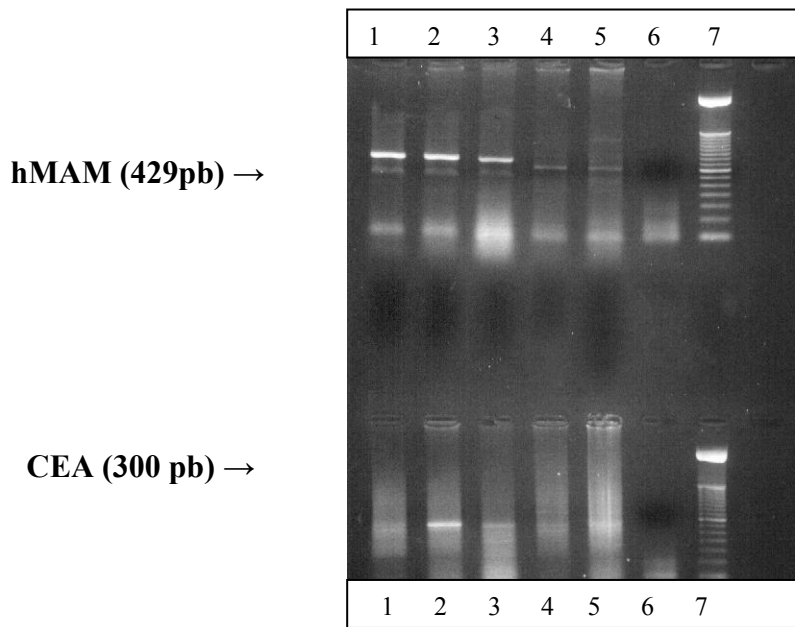


Figura 5 - Resultado da RT-PCR para hMAM e CEA em Mama (1), Tumor (2), Linfonodo (3), Sangue (4) e Medula óssea (5)

As bandas 6 e 7 correspondem à mix sem DNA e ao marcador com 100 pares de bases. Como podemos verificar, houve expressão de hMAM em mama, tumor, linfonodo, sangue e medula óssea. A expressão de CEA foi verificada em tumor, linfonodo, sangue e medula óssea.

Tabela 3 - Correlação entre tamanho do tumor(T) e RT-PCR para os marcadores no tumor

Marcadores	T1	T2	T3	Total
Ambos negativos	2 (8,7%)	1(5,6%)		3(6,8%)
CEA- hMAM +	3(13%)	1 (5,6%)		4 (9,1%)
CEA+ hMAM-		1 (5,6%)		1 (2,3%)
Ambos positivos	18 (78,3%)	15 (83,3%)	3 (100%)	36 (81,8%)
Total	23(100%)	18(100%)	3(100%)	44(100%)

Fonte: Elaborada pela autora, com base na pesquisa.

Nota: Teste de qui-quadrado, P=0,823

Novamente, como a maioria dos tumores expressou ambas as moléculas, não houve associação significativa entre T e a expressão dos marcadores.

Tabela 4 - Correlação entre estadiamento axilar (N) e RT-PCR para os marcadores no tumor

Marcadores	N0	N 1	N2	N3	Total
Ambos negativos	3 (14,3%)				3(6,8%)
CEA- hMAM +	1(4,8%)	2 (16,7%)		1(25%)	4(9,1%)
CEA+ hMAM-	1(4,8%)				1(2,3%)
Ambos positivos	16(76,2%)	10(83,3%)	7(100%)	3 (75%)	36(81,8%)
Total	21(100%)	12(100%)	7(100%)	4(100%)	44 (100%)

Fonte: Elaborada pela autora, com base na pesquisa.

Nota: Teste de qui-quadrado, P=0,563

Houve uma tendência para positividade para ambos marcadores conforme maior o número de linfonodos comprometidos.

Tabela 5 - Correlação entre RT-PCR para os marcadores e o exame histopatológico de rotina dos linfonodos axilares

	Patologia negativa n (%)	Patologia positiva n (%)	RT-PCR total n (%)
CEA positivo	6 (27.3)	12 (52.2)	18 (40)
CEA negativo	16 (72.7)	11 (47.8)	27 (60)
Total	22 (100)	23 (100)	45 (100)
Teste de qui-quadrado, P= 0,086			
hMAM positivo	2 (8.7)	10 (43.5)	12 (26.1)
hMAM negativo	21 (91.3)	13 (56.5)	34 (73.9)
Total	23 (100)	23 (100)	46 (100)

Fonte: Elaborada pela autora, com base na pesquisa.

Nota: Teste de qui-quadrado, P= 0,005

Nesta tabela, ressaltamos a observação que seis pacientes (27,3%) tiveram patologia dos linfonodos axilares negativa, mas CEA expresso nos mesmos. Duas pacientes (8,7%) tiveram patologia negativa e hMAM expresso no linfonodo.

Tabela 6 - Correlação entre RT-PCR para os marcadores no sangue e o estadiamento linfonodal

	Linfonodo negativo (%)	Linfonodo Positivo (%)	Total
CEA positivo		2 (12,5)	2 (5,7)
CEA negativo	19 (100)	14 (87,5)	33 (94,3)
Total	19 (100)	16 (100)	35 (100)
Teste de Qui-quadrado, P= 0,070			
hMAM positivo	2 (10)	3 (18,8)	5 (13,9)
hMAM negativo	18 (90)	13 (81,3)	31 (86,1)
Total	20 (100)	16 (100)	36 (100)

Fonte: Elaborada pela autora, com base na pesquisa.

Nota: Teste de qui-quadrado, P=0,452

As duas pacientes com CEA expresso no sangue também eram linfonodo positivo na histologia. Duas pacientes com mamaglobina expressa no sangue, não apresentaram positividade histológica no linfonodo. Outras três pacientes com hMAM positivo no sangue, também apresentavam linfonodo positivo.

Tabela 7 - Correlação entre RT-PCR para os marcadores na medula óssea e o estadiamento linfonodal

	Linfonodo negativo (%)	Linfonodo Positivo (%)	Total
CEA positivo	1 (7,7)	2 (25)	3 (14,3)
CEA negativo	12 (92,3)	6 (75)	18 (85,7)
Total	13 (100)	8 (100)	21 (100)
Teste de qui-quadrado, P= 0,278			
hMAM positivo	2 (15,4)	3 (37,5)	5 (23,8)
hMAM negativo	11 (84,6)	5 (62,5)	16 (76,2)
Total	13 (100)	8 (100)	21 (100)

Fonte: Elaborada pela autora, com base na pesquisa.

Nota: Teste de qui-quadrado, P=0,253

Uma paciente com expressão de CEA na medula óssea não apresentou linfonodos positivos na histologia e duas pacientes com hMAM expressa na medula óssea também não apresentava linfonodos axilares positivos na histologia.

Tabela 8 - Correlação entre RT-PCR para CEA no sangue e nos Linfonodos

	Linfonodo +	Linfonodo -	Total
Sangue +	1 (7.1%)	1 (4.8%)	2 (5.7%)
Sangue -	13 (92.9%)	20 (95.2%)	33 (94.3%)
Total	14 (100%)	21(100%)	35 (100%)

Fonte: Elaborada pela autora, com base na pesquisa.

Nota: Teste de qui-quadrado, P=0,768

O CEA foi expresso no sangue em 5,7% dos casos, sendo que um deles era negativo no estadiamento axilar.

Tabela 9 - Correlação entre RT-PCR para mamaglobina no sangue e nos Linfonodos

	Linfonodo +	Linfonodo -	Total
Sangue +	2 (25%)	3 (10.7%)	5 (13.9%)
Sangue -	6 (75%)	25 (89.3%)	31 (86.1%)
Total	8 (100%)	28 (100%)	36 (100%)

Fonte: Elaborada pela autora, com base na pesquisa.

Nota: Teste de qui-quadrado, P=0,331

A hMAM foi expressa em 13,9% dos casos no sangue, sendo que 3 casos tinham estadiamento axilar negativo.

Tabela 10 - Correlação entre RT-PCR para CEA na medula óssea e nos linfonodos

	Linfonodo +	Linfonodo -	Total
MO +	2 (25%)	1 (7.7%)	3 (14.3%)
MO -	6 (75%)	12 (92.3%)	18 (85.7%)
Total	8 (100%)	13 (100%)	21 (100%)

Fonte: Elaborada pela autora, com base na pesquisa.

Nota: Teste de qui-quadrado, P=0,278

Tabela 11 - Correlação entre RT-PCR para Mamaglobina na medula óssea e nos linfonodos

	Linfonodo +	Linfonodo -	Total
MO +	2 (40%)	3 (18.8%)	5 (23.8%)
MO -	3 (60%)	13 (81.3%)	16 (76.2%)

Total	5 (100%)	16 (100%)	21 (100%)
-------	----------	-----------	-----------

Fonte: Elaborada pela autora, com base na pesquisa.

Nota: Teste de qui-quadrado, P=0,348

Como podemos confirmar nas tabelas acima, a mamaglobina foi mais expressa que o CEA na medula óssea que o CEA.

Tabela 12 - Comparação entre diferentes tecidos quanto à expressão/positividade de dois marcadores tumorais em 21 pacientes com câncer de mama

<i>Marcador</i>	<i>Mama</i>	<i>Tumor</i>	<i>Medula</i>	<i>Sangue</i>	<i>Linfonodo</i>	<i>P</i>
	<i>Normal</i>		<i>Óssea</i>	<i>Periférico</i>		
hMAM	19 (90) a	18 (86) a	5 (24) b	5 (24) b	5 (24) b	<0,001
CEA	2 (10%) a	17 (81) b	3 (14) a	2 (10) a	8 (38) a	<0,001

Fonte: Elaborada pela autora, com base na pesquisa.

Os dados são apresentados como frequências (percentuais). Letras-índice não coincidentes representam diferenças estatisticamente significativa (Teste de Cochran, P<0,05).

Não foi encontrada associação entre positividade para receptores estrógeno e progesterona e a positividade para antígeno carcinoembrionário ou mamaglobina.

Foi observado um aumento na positividade de CEA no tumor à medida que aumentava o tamanho (T) do mesmo. No entanto, este achado não atingiu significância estatística (P=0,34). O mesmo fenômeno foi observado com relação à taxa de positividade de CEA nos linfonodos, ainda sem significância estatística (P=0,33). O mesmo não foi observado para mamaglobina. No entanto, para o número de linfonodos positivos, observou-se que à medida que aumenta a taxa de positividade do CEA, é detectado maior número de linfonodos positivos; P = 0,048. Mais intensamente, o mesmo fenômeno é observado para mamaglobina,

ou seja, maior expressão de mamaglobina, maior quantidade de linfonodos positivos, $P < 1/1000$, ou seja, 0,001.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As expressões de positividade para os marcadores estudados foram apresentadas em contagens absolutas e, para facilitar o entendimento, apesar do n pequeno também foram utilizados percentuais. Para comparar os grupos de observações emparelhadas, utilizamos o teste de Cochran com obtenção de significância pelo método exato. A localização de diferenças foi realizada com o procedimento de McNemar também baseado em método exato (distribuição binomial) seguido de posterior ajuste de valores P pelo método de Finner (Bonferroni modificado). O nível de significância adotado foi $\alpha = 0,05$. Os dados foram processados e analisados com auxílio do programa SPSS – versão 11.5.

6 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, vários estudos têm sido realizados para identificar marcadores moleculares de micrometástases de câncer de mama por RT-PCR. O marcador ideal, expresso somente em amostras de tumor e não em tecidos normais, ainda não foi identificado. Os marcadores já testados por RT-PCR para identificação de micrometástases de câncer de mama incluem CK19, CEA, c-Met, maspin, MUC-1, $\beta 1 \rightarrow \text{GalNac-T}$, p97, TGF- β e hMAM. (36, 46, 50, 51) Todos estes marcadores têm sido considerados específicos de câncer de mama com base na análise por RT-PCR de tecidos tumorais e tecidos normais. No estudo de Min et al (52), CK 19, MUC-1, mapsina, VEGF e TGF- β foram expressos em uma frequência elevada de tecidos normais, tornando os marcadores de pouca valia para a pesquisa de micrometástases. Outro estudo publicado por Marchetti et al., avaliaram sete marcadores considerados potenciais para micrometástases de mama: CK 19, CEA, hMAM, c-Met, MUC-1, $\beta 1 \rightarrow 4\text{-N-acetylgalactosaminatransferase}$ ($\beta 1 \rightarrow \text{GalNac-T}$) e p97. Somente hMAM e CEA não foram identificados em 18 linfonodos de indivíduos normais, sugerindo que a especificidade destas moléculas para carcinomas mamários seja superior. (58)

Nosso estudo teve a intenção de utilizar a mamaglobina e o CEA como marcadores de micrometástases de câncer de mama em linfonodos, medula óssea e sangue periférico. A idéia de testar também tumor e tecido normal visou confirmar que estes marcadores são expressos somente em tecido com neoplasia. A maioria dos tumores tiveram positividade para CEA (77,6%) e para hMAM (85,7%). Uma grande percentagem de tecidos ditos normais de mama teve expressão de hMAM (79,6%), indicando tratar-se de um gene expresso em tecido mamário normal. O CEA foi expresso em 12,2% dos tecidos mamários (6 pacientes), o que foi inesperado por tratar-se de um marcador eminentemente de células neoplásicas, não

existindo evidências de sua expressão em tecidos normais fora do trato gastrointestinal. A possível explicação para expressão de CEA em tecido mamário “normal” pode ser a existência de modificações moleculares prévias à neoplasia que já expressem o marcador ou contaminação da amostra por células neoplásicas. Há dúvida de quanto é “normal” o tecido mamário de uma mama na qual o câncer já apareceu.

No estudo de Marchetti et al., os poucos casos com patologia positiva e marcadores negativos (3 casos hMAM e 19 casos CEA), foram justificados por falha na amostragem tecidual. (58) Os autores concluíram que a mamaglobina é o melhor marcador para detecção de metástases ocultas de câncer de mama. O nosso estudo identificou uma percentagem maior de tumores com expressão de mamaglobina que CEA. Na identificação de doença dita micrometastática, CEA foi positivo em 6 linfonodos com patologia negativa e a mamaglobina em 2 linfonodos com patologia positiva. No sangue e medula óssea houve maior número de casos positivos para mamaglobina (sangue = 3 e medula óssea = 5) que para o CEA (sangue = 2 e medula óssea = 3), mas esta diferença não foi estatisticamente significativa. Uma percentagem significativa de pacientes com axila positiva não apresentou expressão de nenhum marcador no linfonodo (CEA = 11 casos e hMAM = 13 casos). Isto aconteceu porque não foi possível realizar RT-PCR no linfonodo sentinela, pois para esta avaliação o patologista necessita incluir no exame histopatológico todo o gânglio para evitarem falso-negativos. Os linfonodos analisados por RT-PCR foram aleatoriamente escolhidos entre os gânglios do primeiro nível. No estudo de Marchetti et al., também ocorreram alguns casos com patologia positiva e RT-PCR negativa, sendo justificados por erro na amostra do linfonodo, devido à provável presença de células tumorais na metade analisada na histologia e sua ausência na metade processada por RT-PCR. (58)

A análise de sangue periférico de pacientes com câncer de mama, identificou 2/35 (5,7%) pacientes com expressão de CEA no sangue e 5/36 (13,9%) pacientes com expressão

de mamaglobina. A medula óssea foi avaliada em 21 pacientes que autorizaram a coleta do aspirado antes da cirurgia da mama. A expressão de CEA e hMAM foi positiva em 3 (14.3%) e 5 (23.8%) amostras de aspirado, respectivamente. Um estudo prévio de Zhong et al. avaliou a expressão de CEA em medula óssea de pacientes com câncer de mama sem evidências de metástases à distância e em sangue periférico e medula óssea de voluntários sem neoplasia. (59) Nenhuma amostra dos controles normais foi positiva e 27.6% (50/181) das amostras de medula óssea das pacientes com câncer de mama foi positiva para CEA. Assim como os nossos achados, os autores concluem que a detecção de CEA por RT-PCR como marcador único de micrometásases de câncer de mama é limitante pela heterogeneidade das células tumorais além da deficiente expressão de CEA nas células tumorais micrometastáticas. Neste estudo, sugere-se que o CEA seja utilizado como marcador em pacientes cujo tumor primário seja conhecidamente positivo. Nossos resultados sugerem que esta observação possa ser pertinente, já que todas as pacientes com CEA no sangue e medula óssea, apresentaram tumor com expressão de CEA.

Um outro estudo publicado por Berois et al., comparou a expressão de 3 marcadores por RT-PCR de medula óssea e sangue periférico de 42 pacientes com câncer de mama antes do tratamento cirúrgico. (60) Os marcadores estudados foram CEA, MUC1 e CK19. O marcador MUC1 apresentou resultado falso-positivo em 12/20 aspirados de medula óssea de controles normais, enquanto que o CEA e a CK19 não foram expressos em nenhum controle. Nos aspirados das pacientes com câncer de mama, o CEA foi positivo em 12/42 (29%) e a CK19 em 20/42 (48%) das pacientes. Os autores identificaram uma associação positiva quando o aspirado apresentava expressão dos dois marcadores com estadiamento axilar positivo. Nossos resultados mostraram uma tendência de associação entre o número de linfonodos positivos e a positividade para CEA, assim como também o tamanho do tumor e a presença do CEA. A hMAM apresentou a mesma tendência, mas somente com os linfonodos.

Ainda no estudo de Berois et al., ambos marcadores foram positivos em 4/24 (17%) pacientes com estadiamento linfonodal negativo. (60) Nossos resultados mostram uma porcentagem menor de positividade na medula para o marcador CEA - 14,3%. Das três pacientes com CEA expresso no aspirado de medula óssea, 1 apresentava histologia negativa nos linfonodos. Entretanto, esta paciente teve expressão de CEA identificada no linfonodo também. O estudo de Berois não avaliou a expressão molecular nos linfonodos, somente em sangue periférico e medula óssea. Um outro dado interessante deste estudo é que as amostras de aspirado de medula óssea foram coletadas tanto de crista ilíaca quanto de esterno. Quando se avaliou somente os resultados de crista ilíaca, a positividade para CEA foi para 21% (3/14) e para 13% (1/8) para CK 19. Estes resultados aproximam-se mais dos nossos, onde todos os aspirados foram realizados de crista ilíaca. Os autores sugerem que ambos os sítios devem ser aspirados para melhorar a sensibilidade do método. (60) Talvez a maior positividade do aspirado esternal ocorra devido à situação anatômica do mesmo, estando mais próximo das mamas. Esta observação traz o questionamento do potencial destas células circulantes tornarem-se micrometástases reais. Provavelmente exista uma determinada quantidade de células que atinjam a medula esternal pela proximidade com o tecido mamário lesado e que é manipulado desde o momento da biópsia do nódulo mamário. Ainda neste estudo, o sangue periférico teve expressão de CEA em 1/37 (3%). CK19 em sangue periférico foi expressa em 13/37 (35%). Nossos resultados foram similares com uma positividade de CEA em sangue periférico de 5.7% (2/35 casos). A mamaglobina foi mais sensível em sangue periférico, sendo expressa em 13.9% (5/36 casos) das amostras.

Um estudo recente de Núñez-Villar et al. correlacionou a expressão de hMAM em espécimes de câncer de mama com grau histológico e nuclear, receptores hormonais, c-erbB2, expressão de p53 mutado, ki67, ploidia do DNA, fase S e invasão de linfonodos axilares. (61) A expressão de hMAM foi associada a um fenótipo menos agressivo. No grupo de pacientes

estudado por nós, somente foi possível avaliar a presença de receptores hormonais, tamanho do tumor e metástases linfonodais como fatores de prognóstico. Não houve diferenças significativas com relação aos receptores hormonais. Observamos uma tendência para maior positividade de CEA e hMAM em tumores maiores e com maior número de linfonodos positivos. Outro estudo publicado recentemente por Span et al., evidenciou que a expressão de mamaglobina em altos níveis estava associada com tumores de baixo grau, receptores hormonais positivos e pacientes pós-menopáusicas. (62) Além disso, perceberam-se menores índices de recidiva nas pacientes com expressão de mamaglobina que utilizaram tamoxifeno adjuvante ($p=0.004$). Estes dois últimos estudos foram focados na expressão da mamaglobina no tumor primário. Ainda fica em aberto a questão se isso é atribuível a um mecanismo particular mediado pela mamaglobina. Ou a expressão de mamaglobina é apenas uma característica do epitélio celular mamário normal, que se perde durante a indiferenciação associada ao aumento da transformação maligna. Algumas evidências sugerem que a expressão de mamaglobina está associada à proliferação da glândula mamária e sua diferenciação terminal. (62) O estudo de Span et al. também identificou uma correlação entre hMAM e RP, sugerindo uma possível responsividade estrogênica da expressão de mamaglobina. (62) Em níveis séricos baixos de estradiol após a menopausa, encontraram níveis altos de mamaglobina no tecido mamário que pode argumentar contra uma indução estrogênica mediada da expressão de hMAM. A possibilidade de que a mamaglobina possa ser também um fator preditivo de pacientes que se beneficiariam mais de tratamento endócrino, parece ser possível dada a associação com receptores hormonais e seu valor prognóstico fortemente independente no subgrupo tratado com tamoxifeno.

Devido às limitações de nossa amostra, essas correlações não foram realizadas. Entretanto, um dado interessante observado, apesar de não tratar-se do objetivo deste estudo, foi a evolução das pacientes que entraram neste estudo. As duas pacientes que evoluíram para

óbito até a última avaliação em março de 2005, não apresentaram expressão dos marcadores em sangue ou medula. Entretanto, ambas apresentaram expressão somente de CEA em linfonodo, sendo que uma delas era linfonodo negativo na histologia. As cinco pacientes que apresentaram positividade para um ou ambos marcadores em sangue e/ou medula óssea estão em uso de tamoxifeno adjuvante, sem evidências de doença em atividade até o momento. Estas observações não podem ser extrapoladas, apenas nos mostram que ainda há muito que ser esclarecido e futuros estudos que incluam a evolução das pacientes como desfecho, poderão nos ajudar neste sentido.

Uma das maiores dificuldades que enfrentamos durante a realização desta pesquisa foi conseguir acesso à paciente no momento da cirurgia. Este processo já está automatizado e para que pudéssemos coletar as amostras de sangue, tecido mamário, tumor e medula óssea, precisávamos entrar em sala cirúrgica, pedir permissão ao cirurgião e anestesistas e solicitar material adequado para o procedimento. Estas tarefas acabaram aumentando o tempo de trabalho de toda equipe. Justificar estas alterações na rotina dos outros profissionais nem sempre é fácil. A coleta de uma amostra de tumor também foi impossibilitada em pacientes que apresentavam biópsia prévia com lesão residual pequena, pois poderia atrapalhar a análise do patologista. Isso tudo nos leva a pensar que encontrar um marcador sanguíneo provavelmente seja o ideal, pois certamente será oneroso transpor para a rotina de tantas cirurgias estes procedimentos.

Nossas perspectivas são de investir na busca de marcadores sanguíneos para avaliação de células circulantes, bem como para buscar marcadores de resposta à quimioterapias. Este estudo foi o primeiro de uma linha de pesquisa desenvolvida atualmente no Laboratório de Biologia Tumoral do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS.

7 CONCLUSÕES

A técnica de RT-PCR é capaz de detectar transcritos de CEA e hMAM em medula óssea e sangue periférico de pacientes com câncer de mama. No entanto, o significado clínico deste achado ainda deve ser esclarecido. A detecção em linfonodos para estes marcadores parece estar mais fortemente associada ao prognóstico que a detecção em sangue e medula óssea. A expressão de CEA em linfonodos é pelo menos três vezes mais sensível que a expressão de mamaglobina para detecção de micrometástases em linfonodos cuja histologia foi negativa. Tumores maiores têm maior probabilidade de expressão de CEA e hMAM. Este estudo não encontrou associação entre receptores hormonais e expressão dos marcadores no tumor.

REFERÊNCIAS

- 1 HENDERSON, I. C.; CANELLOS, G. P. Cancer of the breast: the past decade (first of two parts). **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 302, n. 1, p. 17-30, Jan. 1980.
- 2 HENDERSON, I. C.; CANELLOS, G. P. Cancer of the breast: the past decade (second of two parts). **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 302, n. 2, p. 78-90, Jan. 1980.
- 3 SACKS, N. P. M.; Baum, M. Primary management of carcinoma of the breast. **Lancet**, London, v. 342, p. 1402-1408, 1993.
- 4 DENT, D. M. Axillary Lymphadenectomy for breast cancer. **Archives of Surgery**, Chicago, v. 131, n. 11, p. 1125-1127, Nov. 1996.
- 5 HENDERSON, I. C.; PATEK, A. J. The relationship between prognostic and predictive factors in management of breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment, Boston**, v. 52, n. 1-3, p. 261-288, 1998.
- 6 EARLY BREAST CANCER TRIALISTS COLLABORATIVE GROUP. Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomized trials. **Lancet**, London, v. 352, n. 9132, p. 930-942, Set. 1998.
- 7 GELBER, R. D.; Goldhirsch, A.; Coates, A. S. Adjuvant therapy for breast cancer: understanding the overview. *Journal of Clinical Oncology: the Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, New York, v. 11, n. 3, p. 580-585, Mar. 1993.
- 8 MITTRA, I. Axillary lymph node metastasis in breast cancer: Prognostic indicator or lead time bias? **European Journal of Cancer**, Oxford, v. 29A, n. 3, p. 300-302, 1993.
- 9 KOSCIELNY, S. Le. M. G.; TUBIANA, M. The natural history of breast cancer. The relationship between involvement of axillary nodes and the initiation of distant metastasis. **British Journal of Cancer**, London, v. 59, n. 5, p. 775-782, May 1989.
- 10 CABANOS, R. M. An approach for the treatment of penile carcinoma. **Cancer**, New York, v. 39, p. 456-466, 1977.

- 11 BEECHEY-NEWMAN, N. Sentinel node biopsy: a revolution in the surgical management of breast cancer? **Cancer Treatment Reviews**, London, v. 24, n. 3, p. 185-203, June 1998.
- 12 BOBIN, J. Y. et al. Tagging sentinel lymph nodes: a study of 100 patients with breast cancer. **European Journal of Cancer**, Oxford, v. 35, n. 4, p. 569-573, Apr. 1999.
- 13 KRAG, D. et al.: The sentinel node in breast cancer. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 339, n. 14, p. 941-946, Oct. 1998.
- 14 McMASTERS, K. M. et al. Sentinel lymph node biopsy for breast cancer - not yet standard of care. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 339, p. 990-995, 1992.
- 15 GIULIANO, A. E. et al. Improved axillary staging of breast cancer with sentinel node lymphadenectomy. **Annals of Surgery**, Philadelphia, v. 222, n. 3, p. 394-399, Sept. 1995.
- 16 BOLD, R. J. et al. Prospective randomized double-blind study of prophylactic antibiotics in axillary lymph node dissection. **American Journal of Surgery**, New York, v. 176, n. 3, p. 239-243, Sept. 1998.
- 17 KRAG, D. Current status of sentinel lymph node surgery for breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v. 91, n. 4, p. 302-303, Feb. 1999.
- 18 BAUM, M. Reflections on randomised controlled trials in surgery. **Lancet**, London, v. 353(suppl 1), p. 6-8, Apr. 1999.
- 19 YEATMAN, T.J.; COX, C. E. The significance of breast cancer lymph node micrometastasis. **Surgical Oncology Clinics of North America**, Philadelphia, v. 8, n. 3, p. 481- 497, 1999.
- 20 DIEL, I. J.; COTE, R. J. Bone marrow and lymph node assessment for minimal residual disease in patients with breast cancer. **Cancer Treatment Reviews**, London, v. 26, n. 1, p. 53-65, Feb. 2000.
- 21 YEATMAN, T. J.; NICOLSON. G. L. Molecular basis of tumor progression: mechanisms of organ specific tumor metastasis. **Seminars in Surgical Oncology**, [S.l.], v. 9, n. 3, p. 256-263, May/June1993.

- 22 FISHER, B. et al. Ten year results of a randomized clinical trial comparing radical mastectomy and total mastectomy with or without radiation. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 312, n. 11, p. 674-681, Mar. 1985.
- 23 FIDLER, I. J. Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor embolilabeled with ¹²⁵I-5-iodo-2'-deoxyuridine. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v. 45, p. 773-782, 1970.
- 24 UPDYKE, T. V.; NICOLSON, G. L. Malignant Melanoma Cell lines selected in vitro for increased homotypic adhesion properties have increased experimental metastatic potential. **Clinical & Experimental Metastasis**, London, v. 4, n. 4, p. 273-284, Oct./Dec. 1986.
- 25 FERNANDEZ, N. et al. Active specific T-cell-based immunotherapy for cancer nucleic acids, peptides, whole native proteins, recombinant viruses, with dendritic cell adjuvants or whole tumor cell-based vaccines. Principles and future prospects. **Cytokines, Cellular & Molecular Therapy**, London, v. 4, n. 1, p. 53-65, Mar. 1998.
- 26 FIM, O. J.; LOTZE, M. T. Third keystone symposium on cellular immunology and the immunotherapy of cancer: introduction. **Journal of Immunotherapy**, Hagerstown, v. 21, p. 114-118, 1998.
- 27 SHURIN, M. R.; ESCHE, C.; Lotze, M. T. FLT3: Receptor and ligand. Biology and potential clinical application. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, Oxford, v. 9, n. 1, p. 37-48, Mar. 1998.
- 28 ANDERSON, I. et al. Mammographic screening and mortality from breast cancer: the malmo mammographic screening trial. **BMJ**, London, v. 297, n. 6654, p. 943-948, Oct. 1998.
- 29 FISHER, B.; SLACK, N. H. Number of Lymph nodes examined and the prognosis of breast carcinoma. **Surgery, Gynecology & Obstetrics**, Chicago, v. 131, n. 1, p. 79-88, July 1970.
- 30 FISHER, B. et al. Ten year follow up results of patients with carcinoma of the breast in a co-operative clinical trial evaluating surgical adjuvant chemotherapy. **Surgery, Gynecology & Obstetrics**, Chicago, v. 140, p. 528-534, 1975.
- 31 YEATMAN, T. J.; COX, C. E. The significance of breast cancer lymph node micrometastases. **Surgical Oncology Clinics of North America**, Philadelphia, v. 8, n. 3, p. 481-497, July 1999.

- 32 LUDWIG BREAST CANCER STUDY GROUP. Prolonged disease-free survival after one course of perioperative adjuvant chemotherapy for node-negative breast cancer. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 320, n. 8, p. 491-496, Feb. 1989.
- 33 MANSOUR, E. G. et al. Efficacy of adjuvant chemotherapy in high-risk node-negative breast cancer: an intergroup study. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 320, n. 8, p. 485-490, Feb. 1989.
- 34 BOOVA, R. S.; BONANNI, R.; ROSATO, F. E. Patterns of axillary nodal involvement in breast cancer: predictability of level one dissection. **Annals of Surgery**, Philadelphia, v. 196, n. 6, p. 642-644, Dec. 1982.
- 35 MORROW, M.; FOSTER JR., R. S. Staging of breast cancer: A new rationale for internal mammary node biopsy. **Archives of Surgery**, Chicago, v. 116, n. 6, p. 748-751, June 1981.
- 36 LUDWIG BREAST CANCER STUDY GROUP. Prognostic importance of occult axillary lymph node micrometastasis from breast cancers. **Lancet**, London, v. 335, p. 1565-1568, 1990.
- 37 HANSWORTH, P. J. et al. Detection and significance of occult metastasis in node-negative breast cancer. **The British Journal of Surgery**, Bristol, v. 80, n. 4, p. 459-463, Apr. 1993.
- 38 TROJANI, M. et al. Micrometastasis to axillary lymph nodes from carcinoma of breast: Detection by immunohistochemistry and prognostic significance. **British Journal of Cancer**, London, v. 55, p. 303-306, 1987.
- 39 de MASCAREL, I. et al. Prognostic Significance of breast cancer axillary lymph node micrometastasis assessed by two special techniques. Reevaluation with longer follow up. **British Journal of Cancer**, London, v. 66, n. 3, p. 523-527, Sept. 1992.
- 40 FRIEDMAN, S. et al. Importance of tumor cells in axillary node sinus margins ("clandestine" metastasis) discovered by serial sectioning in operable breast carcinoma. **Acta Oncologica**, Stockholm, v. 27, n. 5, p. 483-487, 1988.
- 41 FISHER, E. R. et al. Detection and Significance of occult axillary node metastasis in patients with invasive breast cancer. **Cancer**, New York, v. 42, n. 4, p. 2025-2031, Oct. 1978.

- 42 COX, C. E. Clinical relevance of serial sectioning of sentinel nodes and the detection of micrometastatic nodal disease in breast cancer. **Annals of Surgical Oncology**: the Official Journal of the Society of Surgical Oncology, New York, v. 5, n. 4, p. 297-298, June 1998.
- 43 COX, C. E. et al. Lymphatic mapping in the treatment of breast cancer. **Oncology**, Basel, v. 12, n. 9, p. 1283-1292, Sept. 1998.
- 44 COX, C. E. et al. Guidelines for sentinel node biopsy and lymphatic mapping of patients with breast cancer: Lymphatic mapping and sentinel node biopsy in the patient with breast cancer. **Annals of Surgery**, Philadelphia, v. 227, n. 5, p. 645-653, May 1998.
- 45 FISHER, E. R. et al. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project (Protocol n° 4) V: significance of axillary nodal micro and macrometastasis. **Cancer**, New York, v. 42, n. 4, p. 2032-2038, Oct. 1978.
- 46 SCHREIBER, R. H. et al. Microstaging of breast cancer patients using cytokeratin staining of the sentinel lymph node. **Annals of Surgical Oncology**: the Official Journal of the Society of Surgical Oncology, New York, v. 6, n. 1, p. 95-101, Jan./Feb. 1999.
- 47 SCHOENFELD, A. et al. The detection of micrometastasis in peripheral blood and bone marrow of patients with breast cancer using immunohistochemistry and reverse transcriptase polymerase chain reaction for keratin 19. **European Journal of Cancer**, Oxford, v. 33, p. 854-861, 1997.
- 48 OZBAS, S.; DAFYDD, H. Purushotham AD: bone marrow micrometastasis in breast cancer. **The British Journal of Surgery**, Bristol, v. 90, n. 3, p. 290-301, Mar. 2003.
- 49 MATTANO JR., L. A.; MOSS, T. J.; EMERSON, S. G. Sensitive detection of rare circulating neuroblastoma cells by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Cancer Research**, Chicago, v. 52, n. 17, p. 4701-4705, Sept. 1992.
- 50 DATTA, Y. H. et al. Sensitive detection of occult breast cancer by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Oncology**: the Official Journal of the American Society of Clinical Oncology, New York, v. 12, n. 3, p. 475-482, Mar. 1994.
- 51 MERRIE, A. E. H. et al. Analysis of potential markers for detection of submicroscopic lymph node metastasis in breast cancer. **British Journal of Cancer**, London, v. 80, n. 12, p. 2019-2024, Aug. 1999.

- 52 MIN, C. J.; TAFRA, L.; VERBANAC, K. M. Identification of Superior Markers for Polymerase Chain Reaction Detection of Breast Cancer Metastasis in Sentinel Lymph nodes. **Cancer Research**, Chicago, v. 58, n. 20, p. 4581-4584, Oct. 1998.
- 53 ZIPPELIUS, A. et al. Limitations of reverse-transcriptase polymerase chain reaction analyses for detection of micrometastatic epithelial cancer cells in bone marrow. **Journal of Clinical Oncology**: the Official Journal of the American Society of Clinical Oncology, New York, v. 15, n. 7, p. 2701-2708, July 1997.
- 54 SLADE, M. J. et al. Quantitative polymerase chain reaction for the detection of micrometastases in patients with breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**: the Official Journal of the American Society of Clinical Oncology, New York, v. 17, n. 3, p. 870-879, Mar. 1999.
- 55 MORI, M. et al. 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. **Journal of Clinical Oncology**: the Official Journal of the American Society of Clinical Oncology, New York, v. 16, n. 1, p. 128-132, Jan. 1998.
- 56 WATSON, M. A.; FLEMING, T. P. Mammaglobin, a mammary-specific member of the uteroglobin gene family, is overexpressed in human breast cancer. **Cancer Research**, Chicago, v. 56, n. 4, p. 860-865, Feb. 1996.
- 57 ZACH, O. et al. Detection of circulating mammary carcinoma cells in the peripheral blood of breast cancer patients via a nested reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for mammaglobin mRNA. **Journal of Clinical Oncology**: the Official Journal of the American Society of Clinical Oncology, New York, v. 17, n. 7, p. 2015-2019, 1999.
- 58 MARCHETTI, A. et al. mRNA markers of breast cancer nodal metastases: comparison between mammaglobin and carcinoembryonic antigen in 248 patients. **The Journal of Pathology**, London, v. 195, n. 2, p. 186-190, Sept. 2001.
- 59 ZHONG, X. Y. et al. Evaluation of the reverse transcriptase/polymerase chain reaction for carcinoembryonic antigen for the detection of breast cancer dissemination in bone marrow and peripheral blood. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, Berlin, v. 125, n. 12, p. 669-674, Dec. 1999.
- 60 BEROIS, N. et al. Molecular detection of cancer cells in bone marrow na peripheral blood of patients with operable breast cancer: comparison of CK19, MUC1 and CEA using RT-PCR. **European Journal of Cancer**, Oxford, v. 36, p. 717-723, 2000.

61 NÚÑEZ-VILLAR, M. J. et al. Elevated mammaglobin (h-MAM) expression in breast cancer is associated with clinical and biological features defining a less aggressive tumour phenotype. **Breast Cancer Research**: BCR, London, v. 5, n. 3, p. 65-70, 2003.

62 SPAN, P. N. et al. Mammaglobin is associated with low-grade, steroid receptor-positive breast tumors from postmenopausal patients, and has independent prognostic value for relapse-free survival time. **Journal of Clinical Orthodontics**: JCO, Hempstead, v. 22, n. 4, p. 691-698, 2004.

Mammaglobin (hMAM) and carcinoembryonic antigen (CEA) detection by RT-PCR in sentinel lymph node, peripheral blood and bone marrow of women submitted to breast cancer surgical treatment

Morelle AM*, Andrighetti AE*, Alves SL*, Devenz G*, Dias ACO*, Silveira CMB*, Nectoux AV*, Wagner M*, Garicochea B*

*Institute of Biomedical Research and Oncology Department – Hospital São Lucas da Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Abstract

Introduction: The proper indication of breast cancer adjuvant therapy is nowadays based in clinical and pathological prognostic factors. There is an ongoing search for more precise and reliable factors in order to identify patients to which complementary treatment is essential. Mammaglobin (hMAM) and carcinoembryonic antigen (CEA) have been on target of many studies, as they have been considered markers of breast cancer micro-metastasis. The main goal of this study is to evaluate breast cancer micro-metastasis detection via RT-PCR method for hMAM and CEA. **Methods:** Forty nine patients suffering from breast cancer, ranging from I to III in the clinical staging scale, undergoing surgery were evaluated. During surgery, samples of normal mammary gland tissue, tumor, lymph nodes, blood and bone marrow were collected. RT-PCR was performed for CEA and hMAM in the tissues in question. **Results:** CEA transcripts (37/44 cases) and hMAM transcripts (40/44 cases) were detectable in most tumors. Six patients (27.3%) showing negative histology in axillary lymph nodes expressed CEA in these lymph nodes and, in a similar fashion, two patients (8.7%) expressed hMAM in the axillary lymph nodes. Two patients (5.7%) expressed CEA in the blood sample collected and five (13.9%) expressed hMAM. Regarding bone marrow samples, CEA transcripts were found in three patients (14.3%) and hMAM transcripts were detectable in five patients (23.8%). **Conclusion:** The method RT-PCR is capable of detecting CEA and hMAM transcripts in patients suffering from breast cancer. The clinical meaning of this finding has yet to be clarified. The detection of the markers in lymph nodes seems to be more strongly associated to prognosis than their detection in blood and bone marrow samples.

Keywords: breast cancer; micro-metastasis; molecular markers; RT-PCR; mammaglobin; carcinoembryonic antigen

1. Introduction

Close to one million women around the world received the diagnosis of breast cancer in the year 2000 [1]. In Brazil, the number of new cases and obits estimated for 2003 were 9,335 and 41,610, respectively [2]. Statistics points breast cancer as the most frequent malignant neoplasia and the first cause of death by cancer in Brazilian women. Despite these epidemiological data, great advances

have been accomplished in the comprehension of this disease, and many of these advances have been applied implicating in better preventive care, diagnosis and treatment for patients.

Surgical treatment, by means of conservative resections or mastectomy, remains the main therapy choice for breast cancer patients. However, these patients are at a risk of relapse that persists for up to 15 years after the diagnosis of the primary tumor. If the

initial treatment has been conservative surgery followed by radiotherapy, or mastectomy, most relapse incidents are observed in places such as bones, lungs, liver and brain. The occurrence of relapse is due to the presence of micro-metastasis, invisible by investigative methods at the time of diagnosis.

Post-surgery chemotherapy is indicated in the treatment of initial or early breast cancer if the tumor diameter measures more than 1 cm or if the presence of metastatic commitment in axillary lymph nodes is detected [3]. The adjuvant chemotherapy aims to eradicate micro-metastasis and to reduce the risk of relapse and mortality. Therefore, it is not considered a prophylactic measure, but rather, therapeutical to the subclinical disease.

The proper indication of breast cancer adjuvant therapy is nowadays based in clinical and pathological prognostic factors. There is an ongoing search for more precise and reliable factors in order to identify patients to which complementary treatment is essential. Many studies have been performed investigating the presence of molecular markers in mammary gland neoplasia, trying to identify a good marker for micro-metastasis. The ideal marker, which is only expressed by tumor cells, has not been identified yet.

Mammaglobin, recently identified as a specific marker to the mammary gland tissue, has been studied in patients suffering from breast cancer. Zach et al. [4] compared the expression of mammaglobin (hMAM) using RT-PCR in blood samples of breast cancer patients and normal individuals. None of the individuals in the control group presented expression, whereas 25% of the breast cancer patients were positive for mammaglobin transcripts. When compared to other markers, mammaglobin has proven to be more specific and sensitive to breast cancer. More recent studies have linked

mammaglobin expression to breast neoplasia associated to a milder histopathological aggressiveness. Another marker that has been explored in the detection of breast cancer micro-metastasis is the carcinoembryonic antigen (CEA).

Marchetti et al. [5] made a comparison between the expressions of many markers in breast cancer patients. Only CEA and hMAM were not expressed in normal lymph nodes. The sensibility of mammaglobin was superior to the one for CEA; it has enabled the detection of occult metastasis in 1/3 of the cases. Knowing that not all tumor cells express mammaglobin, we have decided to also study the expression of CEA by RT-PCR in breast cancer patients submitted to surgical treatment, in order to investigate tumor cells in the lymph nodes, peripheral blood and bone marrow.

2. Material and Methods

2.1. Patients

Forty-nine breast cancer patients which have been submitted to surgery during the period of June/2000 to January/2004 were selected to participate in the study. Tumor tissue, normal surrounding gland, axillary lymph node, peripheral blood and bone marrow were collected during the surgical procedure. The patients did not have previous diagnosis of carcinoma, as they did not show metastasis and have not received any neoadjuvant treatment. All patients received and sign the Inform Consent Term.

2.2. Sample Collection

Just before surgery, 5 mL of peripheral blood was collected and 5

mL of bone marrow was aspirated from the iliac crest. Both were stored at EDTA and quickly sent to the laboratory. After the tumor was removed, before placing the in formol, the pathologist identified the lesion and sectioned a piece that was immediately stored in liquid nitrogen. The same procedure was performed to a sample of normal mammary gland. When axillary lymph node dissection was being done, as soon as the first level has been reached and removed, the pathologist sectioned the lymph node in half and immediately stored it in liquid nitrogen.

2.3. RNA Characterization and Isolation

Leukocytes from the bone marrow or blood sample and cells originated from the lymph node, tumor and mammary gland tissue were resuspended in 1 mL of TRIZOL® reagent (GIBCO – BRL LifeTechnologies, Inc., Gaithersburg, MD, USA) and incubated for 10 minutes at room temperature. Next, 200µl of chloroform was added and the sample underwent centrifugation at 12.000g for 15 minutes at 4°C (HIMAC CRT15T Refrigerated Centrifuge, HITACHI). The pellet was despised, being the supernatant precipitated with 500µl of isopropanol and kept at room temperature for 10 minutes. After this interval, the sample was centrifuged again at 12.000g for 10 minutes at 4°C. The supernatant was despised and the precipitation of RNA (pellet) was washed with a 70% ethanol solution and dried under vacuum. It was finally resuspended in 20µl of DEPC treated water (GIBCO – BRL Life Technologies, Inc. Gaithersburg, MD, USA) to be stored at – 80°C until next processing. Quantification of total RNA extracted was obtained by optic densitometry (OD) at 260nm. Only samples showing an absorbance ratio

260/280 greater than 1.8 nm were used in the ribonuclease protection assays and in the RT-PCR. Electrophoresis was run at 100 V in buffer solution TAE 1X for 25 minutes. Only samples that remained intact under violet light analysis were utilized.

2.4. cDNA Synthesis

Total RNA microgram was utilized in the complementary DNA synthesis. The *Reverse Transcriptase Chain Reaction* was performed using SuperScript III Rnase H⁻ transcriptase reverse (GIBCO-BRL Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, USA). The total volume of 20µl included the following reagents: 1µg of RNA, 100 pmoles of random hexanucleotides, 3 mM of MgCl₂, 5x enzyme buffer, 10mM of dithiothreitol, 100mM of each one of the dideoxynucleosides, 200 units of SuperScript III and 5U of RNase OutTM Ribonuclease Inhibitor (Recombinant) (GIBCO – BRL LifeTechnologies, Inc., Gaithersburg, MD, USA). The reaction was processed at 25°C for 10 minutes, 42°C for 45 minutes, 99°C for 3 minutes, finishing at 4°C.

2.5 PCR

The identification of mammaglobin and CEA transcripts was performed by the RT-PCR technique. The amplifiers used in the first PCR reaction were the following: Mammaglobin1, Mammaglobin2, CEA1, CEA2. The following sequences identify the bases DR2 (5' ATA AGAAAG AGA AGG TGT GG 3') and D2102 (5' CAG CGG CTT CCT TGA TCC TTG 3') or GAPDH F1 (5' CCA CCC ATG GCA AAT TCC ATG GCA 3') and R1 (5'TCT AGACGG CAG GTC AGG TCC ACC 3') from the mammaglobin gene (n 997 – 3916) and the following identify the CEA

sense (5' TGT CTC TAA CTTGGC TAC TGG 3') and the CEA anti-sense (5' CAC GAT GTT GGC TAG GAT GGT 3') (n 2101 -2341).

The PCR reaction was constituted by 5 µl of complementary DNA in a total solution volume of 25 µl, containing 10 pmol of each primer, 200 pmol of deoxynucleotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 1,5 mM of MgCl₂, 10x enzyme buffer, 2U Taq Polymerase and deionized and bidistilled water autoclaved until it reached the volume 25 µl. The material was submitted to an amplification protocol constituted by: 46 cycles of 95°C per 1 min, 61°C per 1 min and 72°C during 5 min. The PCR reaction was performed by an automatic thermocycler (MJ Research PT150CA, USA). All reactions were accompanied by a mix without DNA, in order to exclude contamination possibilities. The amplification result was verified by electrophoresis in 2% Agarose gel and observed under a ultra-violet transluminator (2011 Macrovue Transluminator LKB, Bromma, Sweden).

3. Results

Table 1
Clinical Stage Distribution

	Frequency	Percentage
CS I	16	32,7
CS IIA	17	34,7
CS IIB	11	22,4
CS IIIA	5	10,2
Total	49	100,0

The table above shows that more than half of the patients in this study were placed in the initial stages of the disease, CS I and CS IIA (67.4%). Estrogen receptors were found in 77.6% (38) of patients and progesterone in 61.2% (30).

3.1. Characteristics of Patients

A total of 49 patients enrolled in the study. But, only 21 presented all the samples viable to statistical analysis. This happened because some of the patients did not accept bone marrow biopsy in the inform consent moment.

The age of the patients ranged between 27 and 82 years old – the average age was 53.5 years old. Infiltrating ductal carcinoma was the most frequent histological type, occurring in 79.6% (39) of the patients. Concerning tumor size, the distribution was: 49% (24 patients) presented T1, 42.9% (21 patients) T2 and 8.2% (4 patients) T3. Forty nine percent (24) of patients presented negative histology in the lymph nodes, 28,6% (14) showed 1 to 4 positive lymph nodes, 14,3% (7) showed 5 to 10 positive lymph nodes and 8.2% (4) more than 10 positive lymph nodes.

The clinical staging distribution is expressed in the following table:

3.2. Markers expressed in tissues

Forty one patients were positive to one or both markers, as it is shown in the table bellow:

Table 2
Results of CEA and hMAM expression in tumor samples

	Positive hMAM	Negative hMAM
Positive CEA	36	1
Negative CEA	4	3
Total	40	4

In five cases (10.2%), the tumor sample was inconclusive for the analysis of CEA and hMAM, due to the presence of nonspecific bands in RT-PCR or absence of RNA in the sample.

3.2.1. CEA

Six patients out of 49 showed CEA expression in normal mammary gland tissue (12.2%). In five of these patients, the tumor also expressed CEA. The tumors were positive for CEA expression in 77.6% (38) of the cases and the lymph nodes were positive to this marker in 36.7% (15) of cases. Two patients (4.1%) showed CEA expression in peripheral blood and 3 (6.1%) showed CEA transcripts in the bone marrow. The two patients that showed expression in the blood sample were among the three that showed it in the bone marrow. All patients that showed expression in peripheral blood, bone marrow and lymph nodes, also showed

transcript of CEA in the tumor tissue, which indicates the legitimacy of CEA as a marker.

3.2.2 hMAM

Mammaglobin transcripts were found in 79.6% (39) of samples containing normal mammary gland tissue and in 85.7% (41) of tumor samples. The lymph nodes were positive to hMAM in 24.5% (12) of cases, from these 10.2% (5) were also positive to the marker in peripheral blood and bone marrow samples. Just as it happened with CEA, the patients showing mammaglobin expression in peripheral blood, bone marrow and lymph nodes also showed its expression in neoplastic tissue. When analyzing both markers together, we found that two patients showed the expression of CEA and hMAM in the peripheral blood and bone marrow samples.

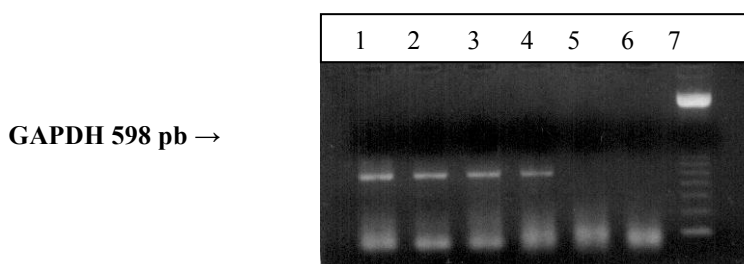


Fig. 1. GAPDH as internal control

GAPDH was the internal control used in this study. It is a gene that encodes a glycolytic enzyme present in every cell. The absence of GAPDH expression shows the absence of RNA in the sample. In the figure above,

GAPDH expression of mammary gland (1), tumor (2), lymph node (3) and blood (4) can be observed. Samples 5 and 6 are controls without RNA and 7 is a marker containing 123 pb.

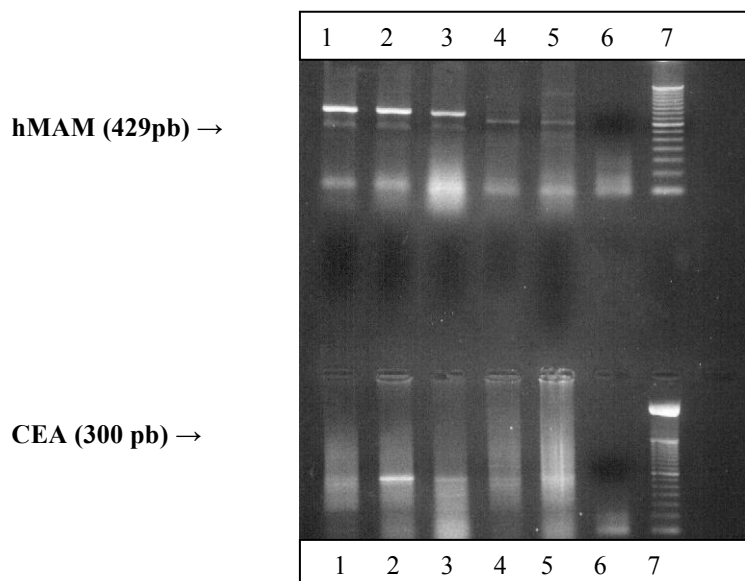


Fig. 2. Results of the RT-PCR to hMAM and CEA in Mammary Gland (1), Tumor (2), Lymph Node (3), Blood (4) and Bone Marrow (5)

Bands 6 and 7 correspond to a mix without DNA and to a marker with 100 pars of bases. As we can notice, there was expression of hMAM in mammary gland tissue, tumor, lymph

node, blood and bone marrow. The expression of CEA was verified in tumor, lymph node, blood and bone marrow.

Table 3
Correlation between RT-PCR screening bone marrow markers and the lymph node staging

	Negative Lymph Node (%)	Positive Lymph Node (%)	Total
Positive CEA	1 (7.7)	2 (25)	3 (14.3)
Negative CEA	12 (92.3)	6 (75)	18 (85.7)
Total	13 (100)	8 (100)	21 (100)
Qui-square test	P= 0.278		
Positive hMAM	2 (15.4)	3 (37.5)	5 (23.8)
Negative hMAM	11 (84.6)	5 (62.5)	16 (76.2)
Total	13 (100)	8 (100)	21 (100)
Qui-square test	P= 0.253		

One patient showing CEA transcripts in the bone marrow sample did not show positive lymph nodes in the histological examination and two

patients with hMAM expression in the bone marrow did not show positive axillary lymph nodes in the histological examination.

Table 4

Comparison of tissues concerning the expression of 2 tumor markers in 21 patients suffering from breast cancer

Marker	Normal Mammary Gland	Tumor	Bone Marrow	Peripheral Blood	Lymph Node	P
hMAM	19 (90) a	18 (86) a	5 (24) b	5 (24) b	5 (24) b	<0,001
CEA	2 (10%) a	17 (81) b	3 (14) a	2 (10) a	8 (38) a	<0,001

The data is presented by means of frequency (percentage). Not coincident letters represent statistically significant differences ($P < 0.05$).

Association between the presence of estrogen and progesterone receptors and the expression of CEA or hMAM was not found.

Rising expression of CEA in tumor cells was observed as its size (T) increased as well. However, this finding did not reach statistical significance ($P=0.34$). The same phenomenon was observed in relation to CEA expression in lymph nodes, also not showing statistical significance ($P=0.33$).

4. Statistical Analysis

The expression of markers was presented in absolute count and, though the low n, they were also presented as percentage, in order to facilitate understanding.

We used the Cochran test, when comparing groups of paired observations, achieving significance by the exact method. The localization of differences was performed using the McNemar procedure, also based on the exact method (binomial distribution) followed by P value adjustments by the Finner method (modified Bonferroni). The significance level adopted was $\alpha = 0.05$. The data was processed and analyzed using the SPSS program – version 11.5.

5. Discussion

Mammaglobin showed a different behavior. However, regarding the positive lymph nodes, as CEA expression increased, we could observe a greater number of lymph nodes affected; $P = 0.048$. This finding was even stronger regarding mammaglobin: the higher the mammaglobin expression, the greater the number of positive lymph nodes, $P < 1/1000$ or 0.001.

In the last years many studies have been performed to identify molecular markers for breast cancer micro-metastasis by RT-PCR. The ideal marker, expressed only by tumor cells and not expressed in normal tissues, has not been identified yet. Markers already tested by RT-PCR to identify breast cancer micro-metastasis include CK19, CEA, c-Met, mapsin, MUC-1, $\beta 1 \rightarrow \text{GalNac-T}$, p97, TGF- β and hMAM [6,7,8,9]. All of these markers have been considered specific to breast cancer in the RT-PCR analysis of tumor cells and normal tissue. In the Min et al [10] study, CK 19, MUC-1, mapsin, VEGF and TGF- β were expressed at a high frequency by normal tissue, making these markers poor in the search for micro-metastasis. Another study published by Marchetti A. and collaborators [11] evaluated 7 potential markers of breast cancer micro-metastases: CK 19, CEA, hMAM, c-Met, MUC-1, $\beta 1 \rightarrow 4\text{-N-acetylgalactosaminatransferase}$ ($\beta 1 \rightarrow \text{GalNac-T}$) and p97. Only hMAM

and CEA were not identified in 18 lymph nodes of normal subjects, suggesting these molecules have better specificity regarding breast carcinoma.

Our study aimed using mammaglobin and CEA as markers of breast cancer micro-metastases in lymph nodes, bone marrow and peripheral blood. The concept behind testing tumor cells and normal surrounding gland aimed the expressed in 12.2% of normal mammary tissue (6 patients), which was an unexpected outcome, regarding the fact that it is a marker expressed only by neoplastic cells. Evidences of CEA expression in normal tissues, excluding the gastrointestinal tract, do not exist. Possible explanations to the expression of CEA in "normal" mammary gland is that the tissue had already suffered molecular modifications before the occurrence of neoplasia that express the marker or the possible contamination of the sample by neoplastic cells. There is doubt about the integrity of the mammary gland surrounding a focus where tumor has occurred.

In the Marchetti A. study [11], the few cases with positive pathology and negative markers (3 hMAM and 19 CEA cases) were justified as failure in the sampling. The authors concluded that mammaglobin is the best marker to detect breast cancer occult micro-metastases. Our study identified a higher percentage of tumors expressing mammaglobin when comparing to the CEA expression. In order to identify micro metastasis, CEA was positive in 6 lymph nodes showing negative pathology and mammaglobin in 2 lymph nodes showing positive pathology. In the blood and bone marrow samples, a higher number of positive cases to mammaglobin could be observed (blood = 3 and bone marrow = 5) when comparing it to CEA expression (blood = 2 and bone marrow = 3), but this difference was not statistically significant. A significant percentage of patients with positive axillary lymph nodes did not express any

confirmation that these markers are expressed only by neoplastic tissue. The majority of tumors were positive to CEA (77.6%) and to hMAM (85.7%). A high percentage of mammary tissue believed to be normal showed hMAM expression (79.6%), indicating that it is a gene expressed in normal mammary gland. CEA was

of the markers in the study (CEA = 11 cases and hMAM = 13 cases). This probably happened because it was not possible to perform RT-PCR in the sentinel lymph node, as the pathologist needs to include the whole node in the histopathological exam to avoid false-negatives. The lymph nodes analyzed by RT-PCR were randomly chosen among the first lymph nodes draining the tumor area. In the Marchetti A. study [11], there were also some cases of positive pathology and negative RT-PCR, being justified by error in the lymph node samples, probably due to the presence of tumor cells in the half of the sample analyzed by histology and absence of tumor cells in the half used in the RT-PCR.

The peripheral blood analysis revealed that 2 patients out of 35 (5.7%) expressed CEA and 5 patients out of 36 (13.9%) expressed mammaglobin in the blood. Bone marrow samples were evaluated in 21 patients, which authorized the aspiration before they were submitted to surgery. CEA and hMAM expression was positive in 3(14.3%) and in 5(23.8%) aspirative samples, respectively. A previous study performed by Zhong XY e collaborators [12] evaluated CEA expression in the bone marrow of breast cancer patients who had no evidence of metastasis and, as control, the study evaluated blood and bone marrow samples of volunteers without neoplasia. Control group samples were all negative and 27.6% (50/181) of the breast cancer patients' samples were positive to CEA. Just as our findings suggest, the authors concluded that CEA detection by RT-PCR

as the one and only marker of breast cancer micro-metastases is limited by the heterogeneity of tumor cells and the poor expression of CEA in micro-metastases cells. In this study, we suggest that CEA is a good marker for those patients known to have an expressing CEA primary tumor. The results agree with our suggestion, indicating that it may be pertinent, since all the patients showing CEA expression in blood and bone marrow samples actually had a primary tumor that expressed CEA as well.

Another study published by Berois N et al. [13] compared the expression of 3 markers using RT-PCR. The authors used bone marrow and peripheral blood samples of 42 breast cancer patients, before they were submitted to surgery. The markers in the study were CEA, MUC1 and CK19. MUC1 showed false-positive results in 12/20 bone marrow samples of the control group, while CEA and CK19 were not expressed by any member of the control group. The samples of the breast cancer patients showed expression of CEA in . Another interesting fact derived from this study is that bone marrow samples were collected from the iliac crest and from the sternum. When the results from the iliac crest were evaluated separately, CEA expression was positive in 21% (3/14) and CK19 expression was positive in 13% (1/8) of the patients. These results are closer to the ones we obtained in our study, where all bone marrow samples were obtained from the iliac crest. The authors suggest that both sites should be aspirated to increase the method's sensibility. Maybe the sternum's greater CEA expression is due to its anatomic position, being closer to the breast. This observation brings about the questioning concerning the power of these circulating cells to turn into real micro-metastases. Probably, there is a certain amount of cells that reach the sternum medulla because of its proximity to the neoplastic breast tissue and because of the manipulation of the area since the breast tumor biopsy. Also in

12/42 (29%) and expression of CK19 in 20/42 (48%) of patients. The authors found a positive association of samples expressing the two markers and positive axillary staging. Our results suggest an association between the number of positive lymph nodes and CEA expression, just as the tumor size and presence of CEA. Mammaglobin showed the same behavior, regarding lymph nodes. In the Berois study, both markers were positive in 4/24 (17%) of the patients presenting negative lymph node staging. Our results show that a smaller percentage of bone marrow samples were positive to CEA marker – 14.3%. Out of three patients with CEA expression in the bone marrow aspiration, one showed negative lymph node histology.

This patient, however, showed CEA expression in the lymph node. The study performed by Berois did not check the molecular expression in the lymph nodes, only doing so in peripheral blood and bone marrow

the Berois study, the peripheral blood expressed CEA in 1/37 (3%) of cases. CK19 was expressed in 13/37 (35%) of the peripheral blood samples. Our results were similar, CEA expression in peripheral blood samples was observed in 5.7% (2/35 cases). Mammaglobin showed greater sensitivity in peripheral blood, being expressed in 13.9% (5/36 cases) of the samples.

A recent study performed by Núñez-Villar and collaborators [14] made a correlation among hMAM in breast cancer with various histological and nuclear grades, hormonal receptors, c-erbB2, mutant p53 expression, ki67, DNA ploidy, S-phase and axillary lymph node invasion. Mammaglobin was associated to a less aggressive tumor phenotype. In the group of patients we studied, it was only possible to evaluate the presence of hormonal receptors, tumor size and lymph node metastasis as factors of prognostic value. There were not significant

differences in relation to hormonal receptors. We observed that big tumors and a large number of positive lymph nodes have a higher chance of expressing CEA and hMAM. A study published by Span PN and collaborators [15] found that high levels of mammaglobin expression is associated with low grade tumors, positive steroid receptors and postmenopausal patients. Besides, they noticed lower relapse indices in patients expressing mammaglobin, who received tamoxifen as adjuvant therapy ($p=.004$). The last two studies cited were focused in the primary tumor mammaglobin expression. It still remains unclear whether this is due to a women, they found high levels of mammaglobin in the mammary tissue, which could serve as an argument against an estrogenic induction of hMAM expression. The idea that mammaglobin could be a predictive factor which will enable patients to benefit more from an endocrine treatment seems to be possible since its association to steroid receptors was revealed and its independent prognostic value in the subgroup using tamoxifen was established.

Due to limitations in our sample, these correlations were not performed.

An interesting fact observed was the evolution of the patients that enrolled in this study, even though it was not the aim of the study. The two patients who died before the last evaluation in March of 2005 did not show markers in the peripheral blood nor in the bone marrow samples. However, both showed CEA expression in lymph nodes, and one of the two patients had negative histology in the lymph node. The five patients who presented positive results to one or both markers in the blood and/or bone marrow are in use of adjuvant tamoxifen, not showing evidence of active disease at the moment. These observations can not be extrapolated, they only show that there is still much to be revealed and encourage other studies to include the evolution of patients in their outcomes.

particular mechanism mediated by mammaglobin or mammaglobin is expressed by the normal mammary tissue, getting lost during the non differentiation associated with malignant transformation. Some evidences suggest that mammaglobin expression is associated to mammary gland proliferation and its terminal differentiation [15]. The Span study also found a correlation between hMAM and steroid receptors, suggesting a possible estrogenic responsiveness in the mammaglobin expression. But studying low estradiol serum levels of post menopausal

6. Conclusion

The RT-PCR technique is able to detect CEA and hMAM transcripts in bone marrow and peripheral blood of patients suffering from breast cancer. However, the clinical significance of this finding still awaits further clarification. The detection of these markers in lymph nodes seems to be more strongly associated to prognosis than their detection in blood and bone marrow. The CEA expression is at least three times more sensitive than mammaglobin detection, regarding micro-metastases in lymph nodes showing a negative histology. Bigger tumors have a higher chance of expressing CEA and hMAM than reduced size ones. This study did not find association between steroid receptors and expression of tumor markers.

References

- [1] Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Global cancer statistics. *CA Câncer J. Clin.* 49 (1999) 33-64.
- [2] Brasil. Instituto Nacional de Câncer. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil, 2003. Available at: <http://www.inca.gov.br>

- [3] Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group. Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomized trials. *Lancet* 352 (1998) 930-942.
- [4] Zach O, Kasparu H, Krieger O, Hehenwarter W, Girschikofsky M, Lutz D. Detection of circulating mammary carcinoma cells in the peripheral blood of breast cancer patients via a nested reverse
- [6] Ludwig Breast Cancer Study Group: Prognostic importance of occult axillary lymph node micrometastasis from breast cancers. *Lancet* 335 (1990) 1565-1568.
- [7] Schreiber RH, Pendas S, Ku NN, Reintgen DS, Shons AR, Berman C, et al. Microstaging of breast cancer patients using cytokeratin staining of the sentinel lymph node. *Am. Surg Oncol.* 6 (1999) 95-101.
- [8] Datta YH, Adams PT, Drobyski WR, Ethier SP, Terry VH, Roth MS. Sensitive detection of occult breast cancer by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J. Clin. Oncol.* 12 (1994) 475-482.
- [9] Merrie AE, Yun K, Gunn J, Phillips LV, McCall JL. Analysis of potential markers for detection of submicroscopic lymph node metastasis in breast cancer. *Br. J. Cancer* 80 (1999) 2019-2024.
- [10] Min JC, Tafta L, Verbanac KM. Identification of Superior Markers for Polymerase Chain Reaction Detection of Breast Cancer Metastasis in Sentinel Lymph nodes. *Cancer Res.* 58 (1998) 4581-4584.
- [11] Marchetti A, Buttitta F, Bertacca G, Zavaglia K, Bevilacqua G. mRNA markers of breast cancer nodal metastases: comparison between mammaglobin and carcinoembryonic antigen in 248 patients. *J. Pathol.* 195 (2001) 186-190.
- [12] Zhong XY, Kaul S, Thompson J, Eichler A, Bastert G. Evaluation of transcriptase polymerase chain reaction assay for mammaglobin mRNA. *J. Clin. Oncol.* 17 (1999) 2015-2019.
- [5] Marchetti A, Buttitta F, Bertacca G, Zavaglia K, Bevilacqua G. mRNA markers of breast cancer nodal metastases: comparison between mammaglobin and carcinoembryonic antigen in 248 patients. *J Pathol.* 195 (2001) 186-190.
- the reverse transcriptase / polymerase chain reaction for carcinoembryonic antigen for the detection of breast cancer dissemination in bone marrow and peripheral blood. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 125 (1999) 669-674.
- [13] Berois N, Varangot M, Aizen B, Estrugo R, Zarantonelli L, et al. Molecular detection of cancer cells in bone marrow na peripheral blood of patients with operable breast cancer. Comparison of CK19, MUC1 and CEA using RT-PCR. *Eur. J. Canc.* 36 (2000) 717-723.
- [14] Nunez-Villar MJ, Martinez-Arribas F, Pollan M, Lucas AR, Sanchez J, Tejerina A, et al. Elevated mammaglobin (h-MAM) expression in breast cancer is associated with clinical and biological features defining a less aggressive tumour phenotype. *Breast Cancer Res.* 5 (2003) 65-70.
- [15] Span PN, Waanders E, Manders P, Heuvel JJ, Foekens JA, Watson MA, et al. Mammaglobin is associated with low-grade, steroid receptor-positive breast tumors from postmenopausal patients, and has independent prognostic value for relapse-free survival time. *JCO* 22 (2004) 691-698.