

IDENTIFICACIÓN DEL GANGLIO CENTINELA EN CÁNCER DE COLON CON TÉCNICA DE AZUL PATENTE V.

ARGIMIRO RODRÍGUEZ, RUBÉN HERNÁNDEZ, JOSEFA MARÍA BRICEÑO, ARON KRYGIER, DAVID PARADA, SARA MAISSI, RAFAEL BARRIOS, ROBERTO RAMÍREZ

SERVICIO DE VÍAS DIGESTIVAS, HOSPITAL ONCOLÓGICO "PADRE MACHADO", CARACAS, VENEZUELA.

RESUMEN

OBJETIVOS: Estudiar la factibilidad de la detección del ganglio centinela en el cáncer de colon, determinando su exactitud diagnóstica y valor en la estadificación de estos pacientes. **MÉTODOS:** Se incluyeron todos los pacientes con diagnóstico histológico y endoscópico de cáncer de colon, excluyéndose aquellos con radioterapia o quimioterapia previa, o antecedentes de cirugías abdominales. Se inyectó peritumoralmente y subseroso 1 mL de Azul Patente V®, realizando la cirugía habitualmente indicada, identificando en el transoperatorio o ex vivo el ganglio centinela. A los ganglios hematoxilinaeosina negativos se les realizó inmunohistoquímica. **RESULTADOS:** Se incluyeron 16 pacientes con cáncer de colon. Se identificó el ganglio centinela en 62,5 % de los casos. Hubo 20 % de falsos negativos. Todos los ganglios centinelas negativos por hematoxilina y eosina lo fueron por inmunohistoquímica. No hubo correlación estadísticamente significativa entre las características propias del tumor y la identificación del ganglio centinela. **CONCLUSIONES:** La determinación del ganglio centinela es factible en el cáncer de colon. Su hallazgo no se relaciona estadísticamente con el tamaño, grado de diferenciación y ubicación del tumor o valores predeterminados de antígeno carcinoembrionario. Hace falta la convalidación del tiempo y estudios comparativos para establecer el valor pronóstico de este procedimiento.

PALABRAS CLAVE: Cáncer, colon, diagnóstico, estadiaje, ganglio centinela.

SUMMARY

OBJECTIVES: Determine the feasibility of sentinel lymph node detection in colon cancer. The diagnostic accuracy of the procedure and its value as a staging tool is also evaluated. **METHODS:** We included in this series patients with diagnosis of colon cancer made by endoscopy and biopsy. Previous abdominal surgery or radiochemotherapy were considered exclusion criteria. Patent blue dye was injected around the tumor in the subserosa. Surgery was continued in the usual manner. Intraoperatively or after the completion of the surgical procedure (ex-vivo) the sentinel node was identified and sent separately for histopathological analysis. Immunohistochemistry was performed in negative sentinel lymph nodes evaluated with routine hematoxylin-eosin staining. **RESULTS:** 16 patients with colon cancer were included in this series. Sentinel lymph nodes were identified in 62.5 % of cases. There was a 20 % false negative rate. All sentinel lymph nodes negative with hematoxylin-eosin were negative with immunohistochemical studies. No statistically significant correlation was found between sentinel lymph node identification and tumor characteristics. **CONCLUSIONS:** Sentinel lymph node identification is a feasible procedure in colon cancer. It can be performed in all cases regardless of tumor location, size or histologic grade. Identification rates are not related to previous carcino embryonic antigen values, vascular or lymphatic embolism. Larger series are required to validate the procedure.

KEY WORDS: Cancer, colon, diagnoses, stages, sentinel lymph node.

Recibido: 02/10/2005 Revisado: 02/11/2005

Aceptado para Publicación: 12/11/2005

Correspondencia: Dr. Argimiro Rodríguez Q.
Hospital "Luis Razetti", Barcelona, Estado Anzoátegui,
Venezuela.

Teléfono: (0414) 3171592 E-mail: argimiro@cantv.net

INTRODUCCIÓN

E

l cáncer es la segunda causa de muerte en Venezuela. En el año

1999 se registraron 1 472 muertes sólo por cáncer de colon⁽¹⁾. A pesar los adelantos en los métodos diagnósticos, técnicas quirúrgicas y tratamientos adyuvantes, la cifra de muertes por esta causa no ha descendido significativamente en el último lustro. El estado nodal es el factor pronóstico más importante para determinar supervivencia a los 5 años. En pacientes con cáncer de colon y ganglios negativos, la tasa de supervivencia a los 5 años es de 80 % a 90 %. Cuando hay ganglios positivos baja la sobrevida a 69 %, si es un solo ganglio y a 27 % si hay seis o más ganglios positivos⁽²⁻⁴⁾. El 20 % de los pacientes en estadio I y II, según la clasificación TNM⁽⁵⁾, es decir, sin ganglios positivos, recaen y mueren por enfermedad sistémica. El uso de la detección del ganglio centinela en la patología colorrectal neoplásica trata de resolver la interrogante planteada en los casos que son ganglios negativos y presentan pobre evolución⁽⁶⁾. El ganglio centinela está definido como el ganglio o grupo de ganglios correspondientes a la primera estación donde hacen metástasis las células neoplásicas, evidenciado por diversos métodos. A diferencia de otras neoplasias como melanoma o mama, la detección del ganglio centinela en el cáncer de colon no está orientada a cambiar el procedimiento quirúrgico, manteniéndose la resección completa en una sola pieza del colon y su mesenterio hasta los ganglios principales como el estándar de tratamiento. Identificar el o los primeros ganglios que drenan el tumor debe, teóricamente, predecir el estado ganglionar del resto de la pieza; en otro sentido, el identificar este ganglio centinela permite hacer un estudio histopatológico más exhaustivo, siguiendo los lineamientos aprobados para el análisis de ganglios centinelas⁽⁷⁾. Con el auxilio de la inmunohistoquímica puede determinarse la presencia o no de micrometástasis en este grupo de ganglios. El significado pronóstico de este hallazgo es actualmente controversial. Se han reportado series que evidencian menor super-

vivencia en pacientes con micrometástasis comparados con grupos similares sin micrometástasis⁽⁶⁾.

Uno de los métodos empleados para la determinación del ganglio centinela en cáncer de colon y recto es el uso del colorante vital azul patente V[®], siguiendo los pasos descritos por Wood y Saha de la Universidad de Michigan^(8,9), y por Tsioulis y Bilchik, del John Wayne Cancer Institute⁽¹⁰⁾. Las diferentes series internacionales reportan una identificación del ganglio centinela de 70 % a 98,8 %^(8,11-14). De los ganglios centinelas hematoxilina eosina negativos, se reportan alrededor de 8,7 % a 25 % de micrometástasis evidenciadas por inmunohistoquímica^(8,9,13,14). Los falsos negativos varían desde 60 % hasta un 9 %^(8,14). Se definen como falsos negativos el valor porcentual entre el número de ganglios no centinelas positivos con ganglio centinela negativo en relación al total de casos de ganglios positivos.

Nuestro objetivo es evaluar la factibilidad del método en el cáncer de colon en pro de futuras implicaciones terapéuticas.

MÉTODOS

Estudio prospectivo realizado en el Servicio de Vías Digestivas del Hospital Oncológico Padre Machado en el período comprendido entre mayo de 2001 hasta octubre de 2002. Se incluyen a todos los pacientes con diagnóstico histopatológico preoperatorio de cáncer de colon planificados para cirugía curativa. Se consideran criterios de exclusión la radioterapia y quimioterapia previa, la cirugía abdominal previa y la presencia de metástasis. Estos pacientes debían tener diagnóstico histopatológico de cáncer de colon hecho a través de biopsia tomada por endoscopia, registrándose el tipo histológico y grado de diferenciación.

Se registraron los niveles de antígeno carcinoembrionario preoperatorio y en todos se realizó tomografía abdominal-pélvica, ecosonograma hepático y radiografía de tórax. Fueron clasificados según el método TNM (AJCC), preoperatoriamente. En el acto operatorio, realizado por abordaje habitual al caso correspondiente, se identificó la lesión tumoral, se inyectó un mL de Azul Patente V® peritumoralmente en la subserosa, y cinco minutos después se exploró la región peritumoral y el mesocolon en busca de trayectos linfáticos coloreados de azul. Se identificó el o los ganglios que se habían coloreado, se marcaron con hilo de sutura y se procedió a continuar la resección de manera habitual. En caso de no identificar ganglios coloreados se procedió de igual manera. Una vez resecada la pieza, en la mesa de disección, fuera del campo quirúrgico, se disecó él o los ganglios coloreados. Los ganglios centinela fueron enviados por separado para evaluación histopatológica. Se cuantificaron el número de ganglios identificados en la pieza y el número de ganglios centinelas. Los ganglios centinela fueron seccionados cada 2 mm a 3 mm, incluidos en parafina, cortados con espesor de 4 µm y coloreados con hematoxilina y eosina. Los reportados como negativos se sometieron a estudio inmunohistoquímico.

Inmunohistoquímica del ganglio centinela: previo a desparafinar e hidratar los cortes histológicos, se procedió a practicar la recuperación de antígenos, utilizando para ello, una vaporera marca Black & Decker®, colocando las láminas durante 20 min a una temperatura de 95° C en la solución DAKO® (S1700) para dicha recuperación. Posteriormente, se lavaron en tres oportunidades con agua destilada por 5 min. Se continuó con la inhibición de la peroxidasa endógena, incubándose el material a temperatura ambiente por 30 min en una solución de peróxido de hidrógeno-metanol al 3 %, (Peróxido de hidrógeno al 30 %, Macrosearch®), lavándose inmediatamente tres veces con

solución de buffer fosfato a pH 7,2 (PBS) por 5 min cada lavado. Se incubaron cada uno de los casos con los anticuerpos primarios monoclonales antígeno de membrana epitelial (EMA pre-diluido, Dako®) y queratina AE1/AE3 (Que-ratina prediluido, Dako®); dichas incubaciones se llevaron a cabo durante 30 min a temperatura ambiente. Las incubaciones con el anticuerpo secundario universal biotinilado unido al complejo enzimático (DAKO® - EnVision®) fueron realizadas a temperatura ambiente durante 10 min en cada caso, posteriormente se hicieron 3 lavados con PBS. Finalmente los cortes de inmunohistoquímica fueron revelados con diaminobencidina, contrastados con hema-toxilina de Meyer, deshidratados con alcoholes a concentraciones crecientes y aclarados con xilol, para finalmente ser examinados en un microscopio de luz, con aumentos directos que oscilaron entre 3,5 X y 40 X. Cada uno de los casos problema fueron corridos con controles positivos (correspondiente a secciones de piel) y controles negativos (en los cuales se añadió PBS en vez del anticuerpo primario). Se tomó como caso positivo cuando se evidenció expresión para uno u otro anticuerpo primario, sin importar la intensidad de reactividad para dicho anticuerpo.

Todos los demás ganglios fueron evaluados histopatológicamente de forma habitual. Métodos estadísticos: se tabularon los datos en una base de datos de Excel para Windows XP® (Microsoft Corp, USA). Se calculó la media y la desviación estándar de las variables continuas; en el caso de las variables nominales, su frecuencia y porcentaje. Para la correlación estadística de variables se utilizó la prueba Chi-cuadrado con la corrección de Yates, la prueba Chi-cuadrado de Pearson y la prueba "t" de Student. Se consideró un valor estadístico significativo si $P < 0,05$ y altamente significativo si $P < 0,01$. Todos los datos fueron procesados con SPSS 10.0 para Windows®.

RESULTADOS

Se incluyeron en el protocolo a un total de 16 pacientes con diagnóstico preoperatorio de cáncer de colon, durante el período comprendido entre mayo de 2001 hasta octubre de 2002. La muestra estuvo constituida por ocho hombres y ocho mujeres con edades comprendidas entre 34 a 85 años, con una media de 54,62 años y una desviación estándar de 15,31. Se disecaron un total de 169 ganglios correspondientes a las piezas quirúrgicas de los 16 pacientes, con un mínimo de 2 ganglios en un caso y un máximo de 24 ganglios en dos casos. En una de las piezas fue reportado sólo plastrón ganglionar. El promedio de ganglios disecados por paciente fue de 10,5 ganglios.

De los 16 casos, se identificó el ganglio centinela en 11 pacientes, lo que representa un 62,5 % de identificación para este estudio con un intervalo de confianza de 35,8 – 83,7. Presentaron positividad para metástasis por hematoxilina y eosina, 3 de los 11 identificados, representando un 27,27 %. De estos 3, en un caso fue el único ganglio positivo cambiando el estadio del paciente de estadio II a estadio III. Ocho casos fueron negativos para metástasis (72,72 %). El promedio de ganglios centinelas por paciente fue de 1,6 ganglios.

Se hallaron 5 casos con ganglios metastásicos, de los cuales, 3 fueron centinelas y uno no centinela. En este último caso el ganglio centinela fue negativo tanto por hematoxilina eosina como por inmunohistoquímica teniendo este paciente un ganglio positivo no centinela, lo que representa para esta serie un 20 % de falsos negativos. Ninguno de los ganglios centinelas negativos por hematoxilina y eosina mostró ser positivo por inmunohistoquímica.

No hubo correlación estadística en cuanto a la identificación del ganglio centinela y la ubicación del tumor primario en colon ($P=0,1668$). Tampoco se evidenció significancia estadística al correlacionar la identificación del

ganglio con el grado de diferenciación del tumor ($P=0,9327$), o al correlacionar la ubicación del ganglio centinela con el número de ganglios centinelas hallados ($P=0,3549$) (Cuadro 1). Al correlacionar el tamaño tumoral por anatomía patológica según TNM y la identificación del ganglio centinela se obtuvo un valor de Chi cuadrado de 0,414 ($P=0,8121$), por lo que no se evidenció significación estadística. Se comprueba de esta manera, en esta serie, que las variables consideradas como ubicación del tumor primario en colon, grado de diferenciación tumoral, ubicación del ganglio centinela y tamaño patológico del tumor no se correlacionan con la identificación del ganglio centinela.

Cuadro 1. Correlación entre las variables clínico-patológicas e identificación del ganglio centinela.

Variables	P
Ubicación del tumor	0,1668
Grado de diferenciación tumoral	0,932
pT	0,812
Embolismo vascular	0,852
Embolismo linfático	0,565

El antígeno carcinoembrionario fue medido preoperatoriamente en 13 de los 16 pacientes, obteniendo resultados que variaron entre 0,8 U/L hasta 65,32 U/L. De estos 13 casos, en 9 pacientes se identificó el ganglio centinela. Estos pacientes tenían valores medios de antígeno carcinoembrionario de 14,72 U/L (desviación estándar de 21,1585). En los 4 casos restantes, donde no se identificó el ganglio, los valores de antígeno carcinoembrionario fueron menores, con una media de 5,99 U/L (desviación estándar de 6,94). A pesar que, el total de ganglios centinelas identificados fue mayor en el grupo con valores

más elevados de antígeno carcinoembrionario, no hubo significación estadística para estas variables, calculándose una $t = 0,789$ con una $P = 0,447$. Otras variables a estudiar fueron; la presencia de embolismo vascular, embolismo linfático e invasión perineural en el tumor de colon y su relación con la identificación del ganglio centinela. La invasión perineural no fue relacionada, pues estuvo presente sólo en dos casos. El embolismo vascular mostró en esta serie una sensibilidad del 66,7 % para la identificación del ganglio centinela con IC (12,5 – 98,2) y una especificidad de 62,5 % con IC (25,9 – 90,0), presentando la prueba un valor global de 63,3 % con IC (31,6 – 87,6) y un Chi cuadrado de Yates de 0,03 ($P = 0,8529$).

El embolismo linfático mostró una sensibilidad de 66,7 % con un IC (12,5 – 98,2) y una especificidad de 75,0 % con IC (35,6 – 95,5) para la identificación del ganglio centinela. En este caso el valor global de la prueba fue de 72,7 % con IC (39,1 – 92,7) y un Chi cuadrado de Yates de 0,33 ($P = 0,5647$).

DISCUSIÓN

En este trabajo se logró identificar al ganglio centinela en un 62,5 % de los casos. Esto coincide con algunas series internacionales como la de Gandy y col.⁽¹⁵⁾, donde se reporta un 63 % de identificación al utilizar Azul Patente V® en 19 pacientes con cáncer de colon. Sin embargo, existen series con un mayor número de casos con un porcentaje de identificación que varía entre 82 % y 98,8 %^(8,9,11,13,16). Estos autores mencionan la posibilidad de aumentar el porcentaje de detección inyectando mayor volumen de colorante según el tamaño del tumor primario, pero en este trabajo se estandarizó el volumen empleado a un mililitro. El promedio de ganglios centinelas por paciente obtenido en este trabajo fue de 1,6 ganglios, cifra que se encuentra reportada en varias de las series referidas. De los 11 casos con ganglio centinela

identificado, resultaron positivos para metástasis sólo 3, representando un 27,7 %. Este valor se encuentra dentro de los reportados por Paramo y col.⁽¹⁶⁾, quienes obtuvieron un 25 % de ganglios centinela positivos en comparación con Saha y col.⁽⁸⁾, quienes reportaron un 34 % de positividad en los ganglios centinelas identificados.

Para esta serie, el valor de falsos negativos fue de 20 %, correspondiente a un solo paciente que mostró ganglio centinela negativo por hematoxilina y eosina y por inmunohistoquímica, y tenía un ganglio metastásico en la raíz del mesocolon. Los reportes en otras series varían entre 4 % a 10 % pero existen series como la de Joosten y col.⁽¹⁴⁾ y Gandy y col.⁽¹⁵⁾, quienes reportan 60 % y 42,8 %, respectivamente.

No se presentaron ganglios centinelas positivos por inmunohistoquímica en ninguno de los ganglios centinela hematoxilina y eosina negativos, este hecho apunta hacia un adecuado análisis histopatológico de nuestras muestras. En otras series, esto varía entre un 8 % a 11 %^(8,16).

VARIABLES tales como, la ubicación del tumor primario, el tamaño tumoral y el grado de diferenciación no se correlacionaron estadísticamente con la identificación del ganglio centinela. Este hecho orienta a pensar que independientemente del grado tumoral y de la ubicación del tumor, la determinación del ganglio centinela es factible. Algunos autores relacionan la mayor posibilidad de hallar al ganglio centinela en relación con el tamaño patológico del tumor⁽¹⁰⁾. La presencia de embolismo vascular, linfático y los valores de antígeno carcinoembrionario tampoco se correlacionaron estadísticamente con la determinación del ganglio centinela. Muchos investigadores han tratado de esclarecer la interrogante de cuántos ganglios es adecuado disecar y cuántos ganglios debe reportar el patólogo para que exista una adecuada

estadificación del paciente. Esto es de capital importancia si recordamos que alrededor del 20 % de los pacientes clasificados como estadios I o II mueren por enfermedad sistémica, es decir, muy probablemente tenían metástasis ganglionares subclínicas al momento de la cirugía. No hay un consenso en los trabajos revisados, pero sí hay pruebas estadísticas que muestran que a mayor número de ganglios negativos disecados la supervivencia es mayor que en los grupos con menor número de ganglios positivos disecados. Esto es especialmente aplicable en los pacientes ganglios negativos⁽¹⁷⁻¹⁹⁾.

Concluimos que, el procedimiento del ganglio centinela en cáncer de colon es un método sencillo y factible, con un adecuado porcentaje de detección. El promedio de

ganglios centinela hallados, así como, el total de ganglios reportados por los anatomopatólogos se encuentran dentro del promedio reportado por series internacionales. El valor de falsos negativos está dentro de los reportados internacionalmente. Aunque en este trabajo no hubo micrometastásis, su presencia es controversial, y no hay consenso en cuanto a su interpretación clínica ni valor pronóstico. Son necesarios estudios a largo plazo, que evalúen la supervivencia en los pacientes catalogados con micrometastásis. Es importante el comparar grupos de pacientes con cáncer colorrectal, a quienes se les realizó estudio anatomopatológico por método de ganglio centinela con grupos que se estudiaron de forma habitual para conocer el real impacto o beneficio de este novedoso procedimiento.

REFERENCIAS

1. División de Sistemas Estadísticos. Ministerio de Salud y Desarrollo Social. Venezuela.
2. Midis G, Feig B. Cancer of the colon, rectum, and anus. En: Feig B, Beger D, Fuhrman G, editores. *The M.D. Anderson Surgical Oncology Handbook*. 2ª edición. Lippincott: Williams and Wilkins; 1999.p.178-222.
3. Wichmann MW, Muller C, Hornung HM, Lau-Werner U, Schildberg FW. Gender differences in long-term survival of patients with colorectal cancer. *Br J Surg*. 2001;88(8):1092-1098.
4. Faivre-Finn C, Bouvier-Benhamiche AM, Phelip JM, Manfredi S, Dancourt V, Faivre J. Colon cancer in France: Evidence for improvement in management and survival. *Gut*. 2002;51(1):60-64.
5. Colon and Rectum. En: Green F, Page D, Fleming I, Fritz A, Balch C, Haller D, Morrow M, editores. *AJCC Cancer Staging Handbook*. 6ª edición. Nueva York: Springer Verlag; 2002.p.127-138.
6. Liefers, GJ, Cleton-Jansen AM, Van de Velde CJH, Hermans J, van Krieken JHJM, Cornelisse CJ, et al. Micrometastases and survival in stage II colorectal cancer. *New Engl J Med*. 1998;339(4):223-228.
7. Keshtgar MRJ, Waddington WA, Ell PJ, Lakhani SR. *The sentinel node in surgical oncology*. Nueva York: Springer Verlag; 1999.
8. Saha S, Wiese D, Badin J, Beutler T, Nora D, Ganatra BK, et al. Technical details of sentinel lymph node mapping in colorectal cancer and its impact on staging. *Ann Surg Oncol*. 2000;7(2):120-124.
9. Wood T, Saha S, Morton D, Tsioulis G, Rangel D, Huchinson W, et al. Validation of lymphatic mapping in colorectal cancer: In vivo, ex vivo, and laparoscopic techniques. *Ann Surg Oncol*. 2001;8(2):150-157.
10. Tsioulis GJ, Wood TF, Morton DL, Bilchik AJ. Lymphatic mapping and focused analysis of sentinel lymph nodes upstage gastrointestinal neoplasms. *Arch Surg*. 2000;135(8):926-932.

11. Fitzgerald TL, Khalifa MA, Al Zahrani M, Law CH, Smith AJ. Ex vivo sentinel lymph node biopsy in colorectal cancer: A feasibility study. *J Surg Oncol.* 2002;80(1):27-32.
12. Paramo JC, Summerall J, Wilson C, Cabral A, Willis I, Wodnicki H, et al. Intraoperative sentinel lymph node mapping in patients with colon cancer. *Am J Surg.* 2001;182(1):40-43.
13. Bendavid Y, Latulippe JF, Younan RJ, Leclerc YE, Dube S, Heyen F, et al. Phase I study on sentinel lymph node mapping in colon cancer: A preliminary report. *J Surg Oncol.* 2002;79(2):81-84.
14. Joosten JJ, Strobbe LJ, Wauters CA, Pruszczynski M, Wobbes T, Ruers TJ. Intraoperative lymphatic mapping and the sentinel node concept in colorectal carcinoma. *Br J Surg.* 1999;86(4):482-486.
15. Gandy CP, Biddlestone LR, Roe AM, O'Leary DP. Intra-operative injection of Patent Blue V dye to facilitate nodal staging in colorectal cancer. *Colorectal Dis.* 2002;4(6):447-449.
16. Paramo JC, Summerall J, Poppiti R, Mesko TW. Validation of sentinel node mapping in patients with colon cancer. *Ann Surg Oncol.* 2002;9(6):550-554.
17. Cserni G, Vinh-Hung V, Burzykowski T. Is there a minimum number of lymph nodes that should be histologically assessed for a reliable nodal staging of T3N0M0 colorectal carcinomas? *J Surg Oncol.* 2002;81(2):63-69.
18. Wong JH, Steinemann S, Tom P, Morita S, Tauchi-Nishi P. Volume of lymphatic metastases does not independently influence prognosis in colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2002;20(6):1506-1511.
19. Goldstein NS. Lymph node recoveries from 2427 pT3 colorectal resection specimens spanning 45 years: Recommendations for a minimum number of recovered lymph nodes based on predictive probabilities. *Am J Surg Pathol.* 2002;26(2):179-189.