

## LINFONODO SENTINELLA (LS): AGGIORNAMENTO RACCOMANDAZIONI UNA PROPOSTA CONDIVISA GIPAM-ANISC

### METODO DI INVIO DI LS

Ogni singolo LS deve essere accuratamente identificato e designato dal chirurgo e posto in idoneo contenitore in formalina neutra tamponata o sottovuoto etichettato e accompagnato da richiesta di esame istologico. Segnalare dati clinici rilevanti e eventuali dati di imaging. Sull'etichetta e corrispondente richiesta è necessario segnalare se si tratta di LS individuati con le metodiche note (radioisotopo e/o blue dye, fluorescenza o altro) o se si tratta di linfonodi adiacenti. In caso di linfonodo post – chemioterapia neoadiuvante (NACT), segnalare se si tratta di LS o di linfonodo marcato. In caso di esame estemporaneo il linfonodo deve pervenire al laboratorio di Anatomia patologica “a fresco”, ossia privo di alcun fissativo, nel più breve tempo possibile, eventualmente avvolto in garza inumidita con fisiologica in modo da evitarne l'essiccamento<sup>1</sup>.

### ESAME INTRAOPERATORIO

I risultati dello studio ACOSOG Z0011, secondo il quale la dissezione ascellare può essere omessa anche in presenza di 1-2 LS metastatici nei trattamenti chirurgici conservativi, hanno notevolmente ridotto la necessità di valutare intra-operatoriamente il LS, anche per evitare sovra trattamenti: pertanto non vi sono indicazioni all'esame intraoperatorio del LS nel caso in cui la paziente sia sottoposta a chirurgia conservativa<sup>2</sup>.

Una ecografia del cavo ascellare pre-operatoria riduce notevolmente la possibilità di trovarsi all'atto chirurgico di fronte ad un LS coinvolto da malattia. Attualmente l'esame estemporaneo potrebbe essere indicato in caso di mastectomia, o laddove, per esigenze cliniche, non è possibile ricorrere ad un eventuale secondo intervento chirurgico sulla paziente.

Occorre tuttavia tenere anche conto che, in base ai risultati dello studio AMAROS, la radioterapia ascellare potrebbe validamente sostituire la chirurgia<sup>3</sup>.

#### A) ESAME INTRAOPERATORIO CRIOSTATICO

Nei casi in cui si effettui l'esame intraoperatorio, il linfonodo va sezionato con i medesimi protocolli adottati per il materiale che verrà incluso in paraffina (vedi paragrafi “PROTOCOLLO DI CAMPIONAMENTO E TAGLIO”). Al termine dell'esame intraoperatorio il tessuto linfonodale rimanente viene fissato in formalina neutra tamponata al 10%, incluso in paraffina ed esaminato secondo le modalità descritte.

È inoltre necessario formalizzare che seguirà la diagnosi definitiva al completamento delle procedure. Se il LS è positivo per macrometastasi al criostato è sufficiente un solo preparato in E&E all'esame definitivo. L'esame intraoperatorio ha basso rischio di falsi positivi, più frequentemente di falsi negativi, con una sensibilità che varia dal 66% al 100% per l'esame criostatico e dal 65% al 94% per l'esame citologico per apposizione. La scelta di una delle due metodiche dipende dalle preferenze e dall'esperienza di ogni singolo centro. L'immunoistochimica rapida è una tecnica utile nei casi di carcinoma lobulare invasivo, consente una migliore e più esatta valutazione delle dimensioni del deposito metastatico e quindi della classificazione di ITC, micrometastasi o macrometastasi.

L'esame intraoperatorio criostatico non è raccomandato nei casi post-NACT (vedi paragrafo “LINFONODO SENTINELLA POST-NACT”) e nei LS di diametro < 3 mm.

#### B) ESAME INTRAOPERATORIO MOLECOLARE

**Ribadendo che l'esame intraoperatorio per i tumori cT1-2 cN0 non è in genere raccomandato**, per i centri attrezzati ad eseguire l'esame molecolare, vanno seguite le raccomandazioni procedurali della casa produttrice. One-step nucleic acid amplification (OSNA®) è la tecnica molecolare di elezione ed è eseguita intraoperatoriamente. La valutazione del tessuto linfonodale con metodica molecolare esclude la valutazione istologica comparativa, tuttavia si

consiglia di effettuare un esame citologico per apposizione al fine di escludere altre patologie linfonodali non metastatiche e per ottenere un preparato morfologico di archivio.

OSNA® è una metodica che si basa sulla estrazione di mRNA da un omogenato di linfonodo, espressa come numero di copie di CK19 mRNA (macrometastasi se > 5000 CK mRNA, micrometastasi se >250 ma <5000 CK mRNA)<sup>4</sup>.

È necessario per tale motivo ricordare che in caso di micrometastasi a focolai multipli, si potrebbe avere una sovrastadiazione pN, per mancanza del dato morfologico di misurazione del deposito metastatico maggiore.

La metodica OSNA non consente l'identificazione delle ITC, per cui non è indicata per la valutazione dei linfonodi sentinella post-NACT. In alternativa all'esame estemporaneo l'analisi molecolare potrebbe essere utilizzata per la valutazione del/i LS in sede post-operatoria.

## PROTOCOLLO DI CAMPIONAMENTO

Valutare e descrivere macroscopicamente il/i LS (colore, forma e dimensioni). Occorre rimuovere con attenzione il tessuto adiposo eccedente, salvaguardando la capsula. Se possibile, far fissare per un paio d'ore per facilitare il sezionamento successivo. Può capitare che all'atto del campionamento si isolino più LS: ognuno va identificato e conteggiato. I LS di diametro < 5 mm vanno sezionati a metà in senso longitudinale e inclusi interamente. I linfonodi con diametro > 5 mm, vanno sezionati lungo l'asse minore, ad intervalli di circa 2 mm, per una più esaustiva valutazione della capsula e del seno marginale<sup>5</sup> ed inclusi in toto, possibilmente in un'unica biocassetta, avendo l'accortezza di poggiare le superfici di taglio così ottenute, sempre nel medesimo verso (eventualmente anche con l'ausilio di spugnette). Tale materiale deve essere incluso dal tecnico rispettando l'orientamento delle sezioni effettuate dal patologo.

## PROTOCOLLO DI TAGLIO AL MICROTOMO

Per diagnosticare un LS macroscopicamente metastatico è sufficiente una singola sezione in E&E, senza ricorso al "multistep sectioning"<sup>6</sup>.

Il protocollo di taglio dovrebbe fornire le più ampie possibilità di rinvenire la malattia metastatica (macro e micrometastasi) per mezzo della colorazione ematossilina-eosina (EE).

**Si propone:** come intervento essenziale N. 3 sezioni a distanza di 200 µm (*livelli*) colorate con EE ed (in aggiunta) N.1 ulteriore sezione "bianca" per eventuale immunohistochimica; se c'è interessamento del livello più profondo, il linfonodo dovrebbe essere esaminato in toto. Eventualmente, a discrezione, si possono eseguire sezioni "bianche" per ogni livello.

## DIAGNOSI

Nella stesura del referto diagnostico si raccomanda l'aderenza al protocollo proposto dall'International Collaboration on Cancer Reporting, cfr allegato 1. (<http://www.iccr-cancer.org/datasets/published-datasets/breast>.)<sup>7</sup>

In particolare, il referto microscopico dovrebbe comprendere:

- il numero totale dei LS ricevuti \* e quindi esaminati
- il numero di LS con malattia metastatica
- l'entità dell'interessamento metastatico espresso in mm, soprattutto per le micrometastasi.
- l'estensione extracapsulare (presente/assente)

Occorre ricordare che:

- qualora si osservassero diversi foci metastatici all'interno di un linfonodo, dovrebbe essere preso in considerazione il più ampio
- linfonodi intramammari non sono LS e sono considerati linfonodi del primo livello
- linfonodi adiacenti (non captanti, né colorati con blue dye) non devono essere considerati nel conteggio totale dei LS, ma linfonodi del primo livello

- sebbene in alcuni studi recenti la prognosi di tali pazienti sia più simile ad una classificazione N3, linfonodi ascellari controlaterali alla lesione mammaria, se metastatici, devono essere considerati M1

Inoltre:

- è raccomandato esplicitare il protocollo utilizzato \*\* e se la positività è stata verificata sulla base della sola E&E o anche dell'immunoistochimica con anticorpi anti-citocheratina \*\*\*
- in caso di linfonodi che giungono frammentati, è raccomandato misurare il frammento con il deposito metastatico di maggiori dimensioni e refertare come: "delle *dimensioni di almeno....*"
- i linfonodi con ITC non devono essere inclusi nel conteggio dei linfonodi metastatici; si segnala la presenza di ITC solo se gli altri linfonodi sono negativi
- nel caso in cui lo stato linfonodale sia determinato unicamente sulla base della biopsia del LS (cioè senza dissezione ascellare), deve essere utilizzato il suffisso "(sn)"
- riportare la stadiazione sec. TNM VIII 2017<sup>8-9</sup>

\*quando il numero dei linfonodi (compreso il/i sentinella) è < 6 deve essere utilizzato il suffisso (sn).

\*\* esempio: "Linfonodo sentinella ridotto con sezioni di 2 mm secondo l'asse minore ed esaminato su sezioni in paraffina condotte ad intervalli di 200 µm (esame microscopico condotto su n. 3 sezioni colorate con ematossilina ed eosina e mediante immunocolorazioni [n. #] con anticorpi anti-citocheratina [clone#]) sec. protocollo SIAPEC-GIPaM-ANISC 2021."

\*\*\* L'immunoistochimica routinaria per l'identificazione di carcinoma nei linfonodi non è raccomandata.

Il Patologo può avvalersi di un approfondimento immunoistochimico in caso di cellule sospette ma non diagnostiche per carcinoma in EE o in caso di linfonodi post NACT; sono utili anticorpi anti cito-cheratine ad ampio spettro (es AE1-AE3) ma possono essere utilizzate anche altre citocheratine (es. CK7 o CK19), tenendo tuttavia conto del fatto che alcuni carcinomi potrebbero non esprimerle (come il carcinoma apocrino che risulta CK7-/CK20+) La colorazione con citocheratine può essere utile per identificare più facilmente la presenza e l'estensione di depositi metastatici in linfonodi da carcinomi lobulari<sup>10</sup>.

Va tuttavia ricordato che alcune cellule non epiteliali (cellule dendritiche del reticolo o cellule linfoidi, nonché detriti di cheratina o squame cornee) possono risultare colorate con anticorpi anti-cheratina. In questi casi si raccomanda un'attenta correlazione con la morfologia.

Qualora vi siano indicazioni di patologia di altra natura o dall' esame istologico risultino metastasi di altra origine, la stadiazione non si applica ed il reperto deve essere esplicitato nella diagnosi.

In caso vengano richiesti i fattori prognostico-predittivi (FPP) ER, PgR, HER2 (e Ki-67), si applicano le stesse linee-guida utilizzate per il tumore primario.

## LINFONODI ASCELLARI

**Livello I:** linfonodi laterali al bordo laterale del piccolo pettorale.

**Livello II:** linfonodi tra il bordo mediale e laterale del piccolo pettorale e i linfonodi interpettorali.

**Livello III:** linfonodi apicali.

I tre livelli dovrebbero fornire una media di 15 linfonodi; poiché attualmente il livello III è eseguito in casi selezionati e deve essere inviato separatamente, gli altri due livelli dovrebbero fornire almeno 10 linfonodi. Non è necessario separare nella diagnosi i livelli I e II.

## PROTOCOLLO DI CAMPIONAMENTO

Al momento dell'esame macroscopico del pezzo chirurgico, andranno ricercati tutti i linfonodi, che potranno essere isolati sia a tessuto fresco che a fissazione avvenuta (in quest'ultimo caso la

ricerca è in genere facilitata). Importante è cercare di eliminare il più possibile il grasso che circonda il linfonodo, al fine di facilitarne la processazione.

Ogni linfonodo macroscopicamente “negativo” deve essere incluso in toto. Il campionamento deve garantire il riconoscimento di tutte le macrometastasi (> 2 mm). Quindi, quando le dimensioni lo consentono, ciascun linfonodo va sezionato con tagli sottili (circa 2 mm) effettuati lungo l’asse minore. Linfonodi di piccole dimensioni possono essere inclusi in singolo blocco. L’inclusione di più linfonodi o di un linfonodo singolo in più parti deve essere descritta in modo da rendere possibile la ricostruzione del numero reale dei linfonodi all’esame microscopico.

Per i linfonodi macroscopicamente metastatici è raccomandabile il prelievo di qualsiasi area sospetta per infiltrazione extralinfonodale.

## DIAGNOSI

Nella stesura del referto diagnostico si raccomanda l’aderenza al protocollo proposto dall’International Collaboration on Cancer Reporting, cfr allegato 1.

([http://www.iccr-cancer.org/datasets/published-datasets/breast.](http://www.iccr-cancer.org/datasets/published-datasets/breast))<sup>7</sup>

In particolare, vanno sempre specificati:

- numero totale di linfonodi esaminati \*: #
- numero di linfonodi metastatici: #
- dimensioni del focolaio di metastasi maggiore: #
- estensione extracapsulare (presente/assente): #
- staging linfonodale (pN sec. TNM VIII edizione 2017): #

\*quando il numero dei linfonodi compreso il/i sentinella è < 6, deve essere utilizzato il suffisso (sn).

## LINFONODO SENTINELLA POST- NACT

In pazienti cN0, la biopsia del LS come unica modalità di stadiazione linfonodale dopo chemioterapia neoadiuvante dovrebbe essere presa in considerazione.

In pazienti cN1-2 prima della chemioterapia neoadiuvante, e con successiva negativizzazione clinico-radiologica post-terapia, dovrebbe essere presa in considerazione l’omissione dello svuotamento ascellare nel caso uno o più linfonodi sentinella, eventualmente identificati con doppio tracciante, risultino negativi. Nel gruppo di pazienti cN+ pre-trattamento dovrebbero giungere al patologo almeno 3 LS possibilmente identificati con doppia metodica. In questo modo il numero di falsi negativi scende a meno del 10%; il linfonodo metastatico, diagnosticato citologicamente/istologicamente prima del trattamento, viene a volte marcato (clip o carbone) e rimosso al momento dell’intervento chirurgico insieme ai LS (se non coincidente). Per quanto riguarda il campionamento macroscopico, devono essere applicati i protocolli sopradescritti (sezioni macroscopiche lungo l’asse minore, ad intervalli di circa 2 mm); per quanto riguarda il protocollo di taglio, è opportuno eseguire livelli a distanza di 100 µm per non perdere eventuali focolai di ITC (la loro presenza infatti esclude una risposta patologica completa-pCR); per questo motivo, è consigliabile che linfonodi post-NACT, in caso di positività pre-terapia (cN+), vadano esaminati fino ad esaurimento del materiale, lasciando sezioni in bianco (almeno in tre livelli diversi) da utilizzare per immunohistochimica con anticorpi anti-citocheratina per meglio identificare minimi depositi metastatici e/o ITC.

Nel caso di linfonodi sentinella negativi pre-chemioterapia (cN0), non avendo attualmente dati sufficienti sul trattamento dell’ascella in caso di positività dopo chemioterapia, si suggerisce al momento l’adozione del medesimo protocollo.

## ESAME INTRAOPERATORIO

E’ cruciale identificare nei linfonodi post-NACT ex cN+ i depositi metastatici anche minimi (ITC o micrometastasi) che rappresentano una risposta patologica parziale e non una pCR e che impattano sulla prognosi e sulle scelte terapeutiche successive.

L'esame intraoperatorio ha le seguenti criticità: i) presenza di artefatti da congelamento, ii) perdita di materiale durante la procedura di taglio che possono portare alla formulazione di diagnosi falsamente negative (o positive) e iii) allungamento dei tempi di intervento a causa della valutazione di 2-3 o più LS.

E' raccomandato pertanto, in linea generale l'esame al definitivo; tuttavia, i centri che per esperienza, tradizione di diagnostica intraoperatoria su LS, disponibilità di personale ed attrezzature dedicate e carichi di lavoro adeguati all'organico, ritengono di assicurare gli stessi standard di qualità, efficienza e di capacità di identificare minimi depositi metastatici, possono eseguire esami intraoperatori, con l'esame completo del LS (ad intervalli di 100 µm fino ad esaurimento del materiale) garantendo, se necessaria, l'esecuzione di immunoistochimica rapida.

## ESAME MICROSCOPICO

La presenza di modificazioni istologiche come aree di fibrosi, associate o meno a focolai di necrosi, e abbondante infiltrato macrofagico, è da interpretare come la risposta alla terapia da parte della malattia metastatica. Tuttavia, la risposta completa della metastasi linfonodale può non lasciare un'evidenza istologica.

Debbono essere descritti e quantificati sia i linfonodi metastatici, sia quelli con aree di fibrosi o focolai di necrosi, sia quelli in cui i due tipi di reperti coesistono. Nei casi in cui non si evidenziano in EE cellule neoplastiche residue è consigliabile l'utilizzo di anticorpi anti-citocheratina.

In accordo con TNM VIII ed., solamente il diametro del focolaio maggiore di carcinoma residuo presente nel linfonodo deve essere considerato per la stadiazione; le alterazioni, come la fibrosi, indotte dal trattamento, adiacenti ai focolai di metastasi, non sono incluse nella misurazione<sup>11</sup>.

Nel caso in cui oltre alla valutazione del RCB sec. MD Anderson<sup>12</sup> si utilizzi anche la classificazione di risposta sec. Pinder et al., i reperti sono così schematizzati<sup>13</sup>:

### Risposta a livello linfonodale

1. Non evidenza di depositi metastatici e non evidenza di modificazioni a carico del parenchima linfonodale.
2. Non evidenza di depositi metastatici ma evidenza di modificazioni (fibrosi, flogosi ecc) che indicano un downstaging legato alla chemioterapia neo-adiuvante.
3. Presenza di depositi metastatici associati a modificazioni indicative di risposta parziale alla terapia.
4. Presenza di depositi metastatici non associati a modificazioni indicative di risposta parziale alla terapia.

## BIBLIOGRAFIA

1. Ministero della Salute - Consiglio Superiore di Sanità, Sezione I: Linee Guida Tracciabilità, Raccolta, Trasporto, Conservazione e Archiviazione di cellule e tessuti per indagini diagnostiche di Anatomia Patologica, Maggio 2015.
2. Giuliano AE, et al. Effect of Axillary Dissection vs No Axillary Dissection on 10-Year Overall Survival Among Women With Invasive Breast Cancer and Sentinel Node Metastasis: The ACOSOG Z0011 (Alliance) Randomized Clinical Trial. JAMA. 2017. PMID: 28898379.
3. Donker M, et al. Radiotherapy or surgery of the axilla after a positive sentinel node in breast cancer (EORTC 10981-22023 AMAROS): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 non-inferiority trial. Lancet Oncol. 2014. PMID: 25439688.
4. Feldman S, et al. A novel automated assay for the rapid identification of metastatic breast carcinoma in sentinel lymph nodes. Cancer. 2011. PMID: 21226034.
5. College of American Pathologists (2020). Protocol for the examination of resection specimens from patients with invasive carcinoma of the breast.
6. Lyman GH, et al. Sentinel lymph node biopsy for patients with early-stage breast cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. J Clin Oncol. 2014. PMID: 24663048.

7. Cserni G, et al. Surgically Removed Lymph Nodes for Breast Tumours Histopathology Reporting Guide (2021). International Collaboration on Cancer Reporting. Sydney, Australia. ISBN: 978-1-922324-11-5.
8. AJCC Cancer Staging Manual (2017). Eight edition. Springer, New York.
9. Brierley JD, et al. (2016). Union for International Cancer Control. TNM Classification of Malignant Tumours, 8th Edition, Wiley-Blackwell, USA.
10. Cserni G, et al. The value of cytokeratin immunohistochemistry in the evaluation of axillary sentinel lymph nodes in patients with lobular breast carcinoma. J Clin Pathol. 2006. PMID: 16497870.
11. Provenzano E, et al. Residual Disease Characterization Working Group of the Breast International Group-North American Breast Cancer Group Collaboration. Standardization of pathologic evaluation and reporting of postneoadjuvant specimens in clinical trials of breast cancer: recommendations from an international working group. Mod Pathol. 2015. PMID: 26205180.
12. [http://www.mdanderson.org/breastcancer\\_RCB](http://www.mdanderson.org/breastcancer_RCB).
13. Pinder SE, et al. Laboratory handling and histology reporting of breast specimens from patients who have received neoadjuvant chemotherapy. Histopathology. 2007. PMID: 17448015.