

BIOPSIA NODULULUI LIMFATIC SANTINELĂ ÎN CANCERUL COLORECTAL. STUDIUL LITERATURII DE SPECIALITATE

CSILLA KOVACS¹, ROLAND KISS², ALINA BEREANU³, LORAND KISS⁴

^{1,2,3,4}Universitatea „Lucian Blaga” din Sibiu

Cuvinte cheie: cancer colorectal, nodul limfatic santinelă, biopsie, micrometastaze

Rezumat: Cancerle colorectale (CCR) sunt cele mai frecvente tumori ale tractului digestiv, atât la femei cât și la bărbați, cu mortalitate crescută, datorită recidivelor locale și a metastazelor. La bolnavii cu cancer de colon rata de supraviețuire este puternic corelată cu statusul ganglionilor limfatici, rata de supraviețuire de 5 ani la pacienții fără metastaze nodulare este de 70-80% (stadiile I și II TNM), în timp ce rata de supraviețuire la bolnavii din stadiul III este de numai 45-50%. (1). Prezența metastazelor ganglionare indică utilizarea tratamentului adjuvant la acești pacienți, ducând la o creștere a ratei de supraviețuire la 5 ani cu aproximativ 10%.(2). În ciuda prognosticului favorabil, la bolnavii cu cancer de colon fără metastaze ganglionare, 20-30% din cazuri totuși vor recidiva după rezecția curativă.(3). Este posibil ca la acești pacienți să existe metastaze ganglionare, care nu au fost detectate prin metoda standard, sau datorită unei limfadenectomii inadecvate, sau examinării histologice insuficiente.(4) Ghidurile actuale recomandă examinarea a 12 noduli limfatici (NL) pentru o stadializare adecvată a bolnavilor cu cancer colorectal.(5). Goldstein și colab. susțin că pentru stadializarea corectă sunt necesari 6-18 NL.(6). Examinarea mai aprofundată a NL, prin reacția imunohistochimică și RT-PCR pot pune în evidență depozitele mici tumorale care au fost ratate la examinarea convențională. Mai mulți autori au raportat o rată de supraviețuire mai scăzută atunci când au fost detectate micrometastaze în NL.(7,8,9,10). Deoarece examinarea tuturor NL este consumatoare de timp și scumpe, examinarea doar a nodulilor limfatici santinelă (NLS) ar putea fi de ajutor. NLS au cel mai mare potențial de a fi metastazați, evaluarea lor fiind mai rentabilă și mai eficientă, iar în plus efectuarea hărții nodulare intraoperator poate detecta căile limfatice aberante de drenaj, ceea ce conduce la o rezecție mai extinsă.

Keywords: colorectal cancer, sentinel lymph node, biopsy, micrometastases

Abstract: Colorectal cancer (CRC) is the most common tumour of the digestive tract, both in women and men, having a high mortality rate due to local recurrence and metastases. In patients with colon cancer, the rate of survival is strongly correlated with the status of the lymph nodes. Patients with no metastatic nodules (TNM stages I and II) have a five-year survival rate of 70-80%, whereas patients in stage III have a survival rate of only 45-50%.(1) The presence of lymph node metastases indicates the use of adjuvant therapy in such patients resulting in an increase in the survival rate to 5 years with approximately 10%.(2) Despite favourable prognosis in patients with colon cancer without lymph node metastases, 20-30% of them will nevertheless relapse after undergoing curative resection.(3) These patients are likely to have lymph node metastases that were not detected by using the standard method, or as a result of inadequate lymphadenectomy, or insufficient histological examination.(4) Current guidelines recommend the examination of 12 lymph nodes (LN) for the proper staging of patients with colorectal cancer.(5) Goldstein et al. argue that proper staging requires 6-18 LN.(6) Further scrutiny of LN, through immunohistochemistry and the RT-PCR reaction, can reveal small tumour deposits that were not detected by conventional examination. Several authors report a lower survival rate when LN micrometastases were detected.(7,8,9,10) Since the examination of all LN is time-consuming and expensive, examining only sentinel lymph nodes (SLN) could be helpful. SLN have the greatest potential of developing metastases, and their evaluation is more cost-effective and more efficient. Moreover, the intraoperative nodular mapping can enable the detection of aberrant lymphatic drainage pathways, which leads to a more extensive resection.

Nodulul limfatic santinelă (NLS) este definit ca fiind primul releu ganglionar, situat în aria de drenaj al unei tumori și este considerat foarte important în practica oncologică. Conceptul de nodul santinelă se bazează pe teoria de diseminare secvențială a tumorilor pe cale limfatică.(11,12,13). În practica clinică, biopsia NLS s-a dovedit a fi foarte eficientă în estimarea corectă a statusului nodular limfatic în melanomul malign și în cancerul mamar.(14) Dacă NLS în cazul cancerului mamar și al

melanomului malign este negativ, gradul de operare poate fi redus la minim, iar în cazul în care NLS este pozitiv, se va efectua disecția ganglionilor limfatici. Detectarea NLS se poate realiza prin injectare de colorant sau radiotrasor în jurul tumorii, după parcurgerea unui protocol propriu de validare a tehnicii.(15) În ultimele două decenii, tot mai mulți cercetători au încercat să lărgescă domeniul de aplicare al conceptului de NLS, și au efectuat biopsia nodulului santinelă în diferite boli

¹Autor corespondent: Kovacs Csilla, Str. Mașiniștilor, Nr 54, Sibiu, România, E-mail: akcsilla@yahoo.com, Tel: +40753 953275
 Articol intrat în redacție în 31.03.2014 și acceptat spre publicare în 20.05.2014
 ACTA MEDICA TRANSILVANICA Iunie 2014;2(2):99-103

maligne.(16) În cazul CCR, beneficiul adus de biopsia NLS este altul decât în cancerul de sân sau melanom. Biopsia NLS nu are intenția de a reduce gradul de extensie al rezecției, își propune să identifice situațiile care ar obliga la o disecție mai extinsă a nodulilor limfatici. Deasemenea un alt scop este de a determina cu acuratețe statusul nodular al pacienților, pentru a identifica riscurile de recidivă sau de progresie a bolii.(17) Prezența sau absența metastazelor ganglionare, fără metastaze la distanță, este cel mai important factor prognostic de supraviețuire la distanță și de recidivă la bolnavii cu CCR operat.(18,19) CCR din stadiile I și II, care conform stadializării nu prezintă metastaze ganglionare, totuși acești bolnavi prezintă recidive în peste 25% din cazuri, ceea ce poate fi explicat fie prin evaluarea incorectă a nodulilor limfatici, fie prin diseminare pe cale vasculară.(20,21) Din acest motiv există o preocupare constantă în comunitatea științifică, pentru a găsi metode care pot identifica acești pacienți cu risc crescut, pentru a putea beneficia de tratament chimioterapic de la început. Multe studii indică faptul că o evaluare mai aprofundată a NL regionali poate detecta prezența metastazelor nodulare, care nu au fost puse în evidență prin metoda convențională. Aceste metode includ examinarea multiseriată, IHC și RT-PCR. Aceste metode de detectare a metastazelor nodulare nu au fost aplicate într-un studiu clinic multicentric, pentru a determina relația lor cu prognosticul bolii și rezultatul tratamentului.(22) Există multe obstacole care împiedică aplicarea acestor metode în testare multicentrică, cel mai important fiind timpul și costul ridicat, deoarece trebuie examinați un număr mare de NL. Din acest considerent, biopsia NLS încearcă să identifice NL regionali, care sunt cel mai probabil metastazați, prin detectarea lor în timpul intervenției chirurgicale, fiind primii ganglioni care drenează limfa. Multe studii au încercat să determine aplicabilitatea conceptului de NLS în cancerul de colon.(23,24,25) Unele studii sugerează că acest concept poate fi aplicat în cazul cancerului de colon cu succes, alte studii, indică faptul că NL care drenează direct tumora, se află în afara limitelor convenționale de limfadenectomie regională.(23,26,27) Paramo și colab. au constatat că NLS fără metastaze oglindesc în 97% din cazuri statusul nodulilor limfatici non santinelă.(28) Rezultate încurajatoare au obținut și Tsioulis și colab. efectuând cartografierea NLS în timpul operației laparoscopice la 14 pacienți cu CCR incipiente. La toți cei 14 bolnavi s-au detectat NLS, au fost recoltați în medie 13,5 NL și 1,3 NLS pentru fiecare pacient. Toți NL au fost examinați cu HE, iar NLS au fost supuși examinării multiseriate și reacției IHC cu citokeratin. Starea NLS a reflectat în mod corect statusul NL regionali în 93% din cazuri.(29) Conform unei recenzii efectuate de van der Zaag ES și colab.(30), centralizând rezultatele, a obținut o rată de identificare al NLS de 90% la bolnavii cu CCR, utilizând metoda „ex vivo”. Sensibilitatea procedurii a fost de aproximativ 70%. Au fost identificate cu o sensibilitate mai mare unele subgrupe, care au inclus pacienții cu 4 sau mai mulți NLS identificați, versus pacienții cu mai puțin de 4 NLS identificați, pacienți cu localizare colonică versus rectală, carcinom incipient, ie pT1/2 versus pT3/4. Saha și colab. au arătat într-un studiu recent în ce măsură se poate utiliza biopsia NLS în practica de rutină.(31) Au investigat 192 de pacienți, și au identificat la 22% din pacienți drenaj limfatic aberant, drenajul în afara marjei de rezecție standard. Aceștia au necesitat schimbarea conduitei operatorii. Pacienții care au necesitat schimbarea conduitei operatorii au prezentat pozitivitate nodulară mai mare (62%), decât cei cu rezecția standard (43%). Marele dezavantaj rămâne rata de detectare și sensibilitatea relativ redusă pentru identificare metastazelor tumorale. Factorii care influențează semnificativ rata de detectare cele mai importante sunt indicii de masă corporală,

experiența centrului și curba de învățare.(14) Numărul mare al rezultatelor fals negative se explică prin drenajul limfatic aberant și prin existența skip metastazelor. Skip metastazele apar atunci când căile limfatice sunt blocate de tumoră. În studiul realizat de Retter și colab. 63% din tumori au fost fals-negative, a fost prezentă invazia limfatică și venoasă.(32) Examinările histopatologice convenționale folosite pentru identificare metastazelor din nodulii limfatici sunt insuficiente datorită numărului redus de noduli recoltați și evaluați, se examinează doar o mică parte din nodul, iar anatomopatologul poate să nu recunoască celulele canceroase datorită volumului redus, sau datorită existenței unui drenaj aberant, nodulii pozitivi lipsesc din piesa rezecată.(31) Extinderea examinării patologice prin examinarea multiseriată cu hematoxilina-eozină (HE), utilizarea tehnicilor de imunohistochimie (IHC) și metodelor moleculare, folosind reacția de polimerizare în lanț (RT-PCR) are ca rezultat o îmbunătățire în identificarea micrometastazelor, a celulelor tumorale izolate, dar examinarea tuturor nodulilor excizați implică un consum de timp și bani ridicat.(33) Pentru a reduce numărul nodulilor examinați s-a propus examinarea doar a NLS. Van der Zaag și colab. în urma examinării multiseriate, IHC și utilizând anticorpi anti-pankeratin a obținut o creștere medie a stadiului în 18,5%.(30) Metoda optimă prin care să fie examinați NLS încă nu a fost definită. Mulți autori au abordat acest subiect. Bembenek și colab. au realizat un studiu multicentric prospectiv, cu scopul de a evalua valoarea clinică a statusului nodal și de a identifica factorii care influențează aceste rezultate. Au detectat cel puțin 1 NLS la 268 de pacienți din 315 (85%). Rata de detecție a fost direct proporțională cu experiența centrului, cu invazia nodulară, cu BMI și cu curba de învățare. Au obținut rezultate fals-negative la 46% din bolnavi. La pacienții cu BMI egal sau mai mic cu 24, rata de detecție este mai crescută, 88%. La 21% din pacienții cu pN0 la examinarea de rutină, au fost detectate micrometastaze sau celule tumorale izolate. Contribuția BNLS față de biopsia standard este încă nespecificată. Trebuie rezolvate problemele tehnice, înainte de a trage concluzii. La un sfert din pacienți în stadiul II, BNLS au relevat micrometastaze și celule tumorale izolate în nodulii limfatici.(14) Evidențele actuale asupra BNLS în cancerul de colon sunt conflictuale. Există studii care au raportat o mare valoare predictivă a BNLS pentru statusul nodal.(34,35) Alții au emis ipoteza unei mai bune stadializări, prin detectarea metastazelor oculte, precum și un randament crescut al recoltării nodulilor (36,37), și au raportat un procent semnificativ de drenaj limfatic aberant în afara marginii de rezecție.(38) Read TE. și colab. au ajuns la concluzia că cartografierea și prelucrarea de rutină al NLS nu îmbunătățește precizia stadializării la pacienții cu cancer de colon.(39) Fleig și colab. au identificat NLS la 98% din pacienți, la 10 pacienți NLS au fost negativi, în timp ce nodulii limfatici non-santinelă au fost metastazați, rata fals negativă a fost de 38%.(40) Merrie și colab. au ajuns și ei la concluzia că nu există concordanță între nodulii limfatici non-santinelă pozitivi și NLS.(41) Van der Zaag a examinat cu metoda standard, realizând secțiuni la interval de 500 microni, pentru toți nodulii limfatici recoltați de la 58 de pacienți cu N0. Ulterior NL au fost examinați cu trei tipuri de anticorpi. Examinarea a relevat celule tumorale izolate în 33% din cazuri, care inițial au fost pN0 la examinarea standard (12% MM, 21% CTI).(17) Alți cercetători au injectat albastru de metilen „ex vivo” submucos, subseros dar și intra-arterial pentru a îmbunătăți recoltarea de NLS. După extirpare NLS au fost examinați standard, iar cei negativi au fost supuși examinării multiseriate cu HE și IHC. În medie s-au recolat 3±1 NLS. Rata de detectare a NLS a fost de 78%. Sensibilitatea în detectarea metastazelor a fost de 75%. NL pozitivi au fost găsiți la 43% din cazuri. Skip metastaze au fost găsite la 4 cazuri.

Modificarea stadiului, respectiv upstaging, N0 la N1mi a fost găsit la 1 caz din 23 de cazuri (4%) în NLS după evaluarea avansată a nodulilor.(42) Un alt studiu efectuat de 25 de chirurghi din 13 instituții a avut ca scop să constate dacă examinarea anatomopatologică convențională a NLS, prezice cu exactitate statusul nodal pentru pacienții cu cancer de colon rezecabil. S-au identificat NLS după 10 minute de la injectarea de albastru isosulfan 1%. NLS au fost identificați la 79 de pacienți, urmată de examinare multiseriată a nodulilor de către un singur anatomopatolog. La examinare histologică, 7 pacienți au avut tumori benigne, din cele 72 de cancere 48 au fost NLS negativi, iar 24 au prezentat metastaze nodulare. NLS a fost detectat la 66 de cazuri, reprezentând 92%, cu o medie de 2,1 noduri pe pacient. NLS a fost negativ în 14 cazuri din 24 de cazuri N+, reprezentând 58%. La examinarea multiseriată a NLS s-au găsit metastaze într-un singur caz, ca urmare rata de fals-negativ la examinare NLS este de 54%. În urma acestui studiu s-a constatat că la pacienții cu cancer de colon cu metastaze nodulare, examinare NLS prin metoda multiseriată, nu a reușit să stabilească statusul nodal în 54% din cazuri. Biopsia NLS, urmată de examinarea multiseriată, utilizată singură, nu îmbunătățește stadializarea în cancerul de colon rezecabil.(19) Cel mai important factor de prognostic în CC cu potențial de vindecare îl reprezintă statusul nodulilor regionali, bolnavii cu NL regionali +, au un mare risc de recidivă, de aceea ei vor beneficia de tratament adjuvant.(19) Rezultatele privind stadializarea în CCR obținute de către AJCC/UICC, oglindesc faptul că stadializarea TNM este în prezent cel mai puternic parametru de prognostic. Indicația de tratament adjuvant la pacienții cu CCR, este ghidată în principal de prezența metastazelor în nodulii limfatici regionali. Definirea statusului nodular este influențat de mai mulți factori, ca de exemplu extensia limfadenectomiei, meticulozitatea cu care anatomopatologul evaluează NL recoltați. Deasemenea există și neconcordanțe între diferitele ediții ale AJCC/UICC privind stadializarea TNM a tumorilor CCR, care ar fi numărul minim de NL recoltați. Se folosesc metode care au ca scop o recoltă cât mai mare de NL din țesutul adipos, cum ar fi injectarea de albastru de metilen, compresia cu acetonă. Rația nodulilor limfatici, care reprezintă numărul de NL pozitivi, din numărul total de NL recoltați, este un factor predictiv superior față de numărul absolut de NL metastazați. Invasia extracapsulară este considerată un factor de prognostic suplimentar. Examinarea multiseriată cu hematoxilină eozină, utilizarea tehnicilor imunohistochimice și a reacțiilor de polimerizare în lanț a nodulilor limfatici recoltați, au dus la o creștere a acurateții diagnosticului histopatologic, dar valoarea clinică a acestor progrese nu a fost încă definită.(46)

Resch A. și Langner C. au analizat într-un studiu recent parametri care pot afecta semnificația clinică a statusului nodular, concentrându-se pe schimbarea definirii NL, a nodulilor limfatici metastazați, a depozitelor tumorale în diferitele ediții ale AJCC/UICC a sistemului de stadializare TNM, privind numărul minim de NL evaluați, rația nodulară, invazia extracapsulară, biopsia NLS și beneficiile aduse de recente tehnici, cum ar fi IHC și analiza moleculară.(46) Chimioterapia adjuvantă a redus numărul recidivelor tumorale a bolnavilor din stadiul III, după sistemul de stadializare TNM al AJCC/UICC. Chimioterapia adjuvantă și exereza totală a mezorectului au redus incidența recidivelor locale.(43,44,45)

Semnificația clinică a NLS recoltați nu a fost încă găsită în practica de zi cu zi, pentru că nu există o metodă standardizată de evaluare a NLS rezecați, ca urmare apar o serie de controverse. Extensia limfadenectomiei, experiența anatomopatologului, aplicarea unor tehnici care cresc randamentul de detectare al NL, modificarea continuă a

sistemului de stadializare în diferitele ediții ale AJCC/UICC, istoricul tratamentelor neoadjuvante, numărul absolut de NL recoltați, prezența invaziei extracapsulare, NLS, numărul secțiunilor histologice examinate convențional, utilizarea IHC și RT-PCR pentru identificarea micrometastazelor, a celulelor tumorale izolate, sunt parametri care pot afecta semnificația clinică a statusului nodular în CCR.(46) Multe studii au ridicat suspiciunea că examinarea de rutină este insuficientă pentru o evaluare corectă a statusului nodular, ceea ce a dus la introducerea unor noi tehnici, cum ar fi biopsia NLS, cu examinarea multiseriată, aplicarea IHC și analize moleculare.(47,48). Deoarece indicația de tratament adjuvant la pacienții cu CCR este aplicată în cazul prezenței metastazelor ganglionilor regionali, identificarea acestor noduli este foarte importantă.(42). Disecția manuală și examinarea standard sunt metodele de evaluare a ganglionilor limfatici, iar această abordare duce la subestimarea bolii și la substadializarea bolnavului. La 30% din pacienții clasificați în stadiile I și II conform sistemului TNM, stabilit de AJCC/UICC, cu noduli limfatici negativi la examinarea standard, apar recidive sau boala evoluează, probabil din cauza metastazelor oculte nedetectate.(49,50,51).O limitare majoră a examinării histopatologice o reprezintă faptul că, doar o mică parte din nodul este examinat, multe zone din NLS rămân neinspectate.(52). Identificarea bolii minime în NLS prin tehnici moleculare, ca un instrument suplimentar în prelucrarea ganglionilor la pacienții cu cancer, poate ajuta la depistarea pacienților cu risc de recidivă, care ar beneficia de tratament adjuvant.(53). Analiza moleculară permite examinarea întregului nodul, ceea ce duce la îmbunătățirea stadializării și o mai bună selecție a bolnavilor.(54). Următoarele caracteristici ar fi relevante pentru markeri: să nu existe nicio expresie a markerului folosit în celulele sistemului imunitar, expresie relativ înaltă și constantă în țesutul tumoral, indiferent de stadiul tumorii, "dowregulation" să fie absentă sau slabă la nivelul tumorii comparativ cu țesutul normal. Ohlsson L și colaboratorii au analizat șapte biomarkeri, dintre care CEA (antigenul carcinoembrionar) a îndeplinit aceste criterii urmată de CK20 (citokeratin 20) și MUC2 (mucin 2).(56) Semnificația reacției de polimerizare în lanț pentru detectarea K20 mRNA a fost investigată în special în biopsia NLS.(57,58,59) Aceste studii au demonstrat superioritatea analizei moleculare în comparație cu examinările convenționale, (examinare standard cu HE, examinarea multiseriată și IHC). Toate aceste tehnici permit examinarea întregului nodul, depășind astfel problema apărută la abordarea standard, ceea ce duce la o îmbunătățire a stadializării și la o mai bună selecție a pacienților care necesită tratament adjuvant. Totuși rămân probleme, nici unul din markerii studiați nu au specificitate, pentru a minimaliza rezultatele fals pozitive sau negative.(60) Problemele au apărut deja în 1996, când Gunn și colaboratorii au găsit expresia genelor K19 în 34 din 40 de NL la pacienții care au suferit rezecția intestinului subțire pentru boli benigne.(61) De asemenea, biomarkerii K20, ACE, GCC mRNA au fost detectați în NL al pacienților cu boli benigne, arătând că există probleme de specificitate care trebuie rezolvate.(62) Un mare dezavantaj al analizelor moleculare este lipsa de standardizare a analizelor, ceea ce împiedică compararea diferitelor studii și includerea acestora în practica de rutină.(55)

Concluzii:

Faptul că în studii s-au folosit metode diferite, s-a studiat un număr mic de bolnavi, este necesar să se inițieze un studiu multicentric, care să asigure un număr suficient de pacienți, o tehnică de detectare corectă a NLS și un examen histopatologic standardizat. Obiectivul primar este de a stabili

valoarea clinică al biopsiei NLS în CCR. În prezent încă nu este clar rolul NLS.

Notă:

Această lucrare a beneficiat de suport financiar prin proiectul "Performanța sustenabilă în cercetarea doctorală și post doctorală – PERFORM", Contract nr. POSDRU/159/1.5/S/138963", proiect cofinanțat din Fondul Social European prin Programul Operațional Sectorial Dezvoltarea Resurselor Umane 2007-2013.

REFERINȚE

1. Hermanek P. pTNM and residual tumor classifications: problems of assessment and prognostic significance. *World J Surg* 1995;19:184-190.
2. Hermanek P. Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in colon cancer. International Multicentre Pooled Analysis of Colon Cancer Trials (IMPACT) investigators. *Lancet* 1995;345:939-944.
3. Wolmark N, Fisher B, Wieand HS. The prognostic value of the modifications of the Dukes' C class of colorectal cancer. An analysis of the NSABP clinical trials. *Ann Surg* 1986 Feb;203(2):115-22.
4. Joseph NE, Sigurdson ER, Hanlon AL, Wang H, Mayer RJ, MacDonald JS, Catalano PJ, Haller DG. Accuracy of determining nodal negativity in colorectal cancer on the basis of the number of nodes retrieved on resection. *Ann Surg Oncol* 2003 Apr; 10(3):213-8.
5. Greene FL, Page DL, Fleming ID et al. American Joint Committee on Cancer—cancer staging handbook, TNM classification of malignant tumors, 129. Springer, New York, NY; 2002.
6. 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;26:179-189.
7. Greenon JK, Isenhardt CE, Rice R, Mojzsisik C, Houchens D, Martin EW Jr. Identification of occult micrometastases in pericolic lymph nodes of Duke's B colorectal cancer patients using monoclonal antibodies against cytokeratin and CC49. Correlation with long-term survival. *Cancer* 1994;73:563-569.
8. Liefers GJ, Cleton-Jansen AM, Velde CJ, Hermans J, Krieken JH, Cornelisse CJ, Tollenaar RA. Micrometastases and survival in stage II colorectal cancer. *N Engl J Med* 1998;339:223-228.
9. Iddings D, Ahmad A, Elashoff D, Bilchik A. The prognostic effect of micrometastases in previously staged lymph node negative (N0) colorectal carcinoma: a meta-analysis. *Ann Surg Oncol* 2006;13:1386-1392.
10. Noura S, Yamamoto H, Ohnishi T, Masuda N, Matsumoto T, Takayama O, Fukunaga H, Miyake Y, Ikenaga M, Ikeda M, Sekimoto M, Matsuura N, Monden M. Comparative detection of lymph node micrometastases of stage II colorectal cancer by reverse transcriptase polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 2002;20:4232-4241.
11. Vajda K, Cserni G, Svebis M, Baltas B, Bori R, Tarjan M. Sentinel lymph node mapping in colorectal cancer. *Hungarian Journal of Surgery* 2002;55(6):375-9.
12. Blidaru A. Ganglionul santinelă în chirurgia oncologică. *Chirurgia (Bucur)* 2006;101(4):357-8.
13. Meșină C, Pașalega M, Calotă F, Meșină M.I, Vilcea D et al. Ganglionul santinelă în cancerul de sân. *Chirurgia (Bucur)* 2006;101(4):359-63.
14. Bembenek AE, Rosenberg R, Wagler E, Gretschel S, Sandler A, Siewert JR, Nāhrig J, Witzigmann H, Hauss J, Knorr C, et al. Sentinel lymph node biopsy in colon cancer: a prospective multicenter trial. *Ann Surg.* 2007;245:858-863.
15. Moga D, Popențiu A, Badiu R, Magdu H, Kiss L. Tehnica ganglionului santinelă n cancerul colorectal. *Jurnal de chirurgie* 2010;6(1):74-84.
16. Kitagawa Y, Ohgami M, Fujii H, Mukai M, Kubota T, Ando N, Watanabe M, Otani Y, Ozawa S, Hasegawa H, et al. Laparoscopic detection of sentinel lymph nodes in gastrointestinal cancer: a novel and minimally invasive approach. *Ann Surg Oncol* 2001;8:86S-89S.
17. Van der Zaag ES, Kooij N, Van de Vijver MJ, Bemelman WA, Peters HM, Buskens CJ. Diagnosing occult tumour cells and their predictive value in sentinel nodes of histologically negative patients with colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol* 2010;36:350-357.
18. Tuech JJ, Regenet N, Ollier JC, Rodier JF. Le ganglion sentinelle dans les cancers du colon et du rectum. *Gastroenterol Clin Biol* 2003;27:204-211.
19. Bertagnolli M, Miedema B, Redston B, Dowell J, Niedzwiecki D, Fleshman J, Bem J, Mayer R, Zinner M, Compton C. Sentinel Node Staging of Resectable Colon Cancer. *Ann Surg* 2004;240:624-630.
20. Patten LC, Berger DH, Rodriguez-Bigas M, Mansfield P, Delpassand E, Cleary KR, Fagan SP, Curley SA, Hunt KK, Feig BW. A prospective evaluation of radiocolloid and immunohistochemical staining in colon carcinoma lymphatic mapping. *Cancer* 2004;100:2104-9.
21. Jemal A, Tiwari RC, Murray T, et al. Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin* 2004;54:8-29.
22. Bertagnolli M, Miedema B, Redstone M, Dowell Jeannette, Niedzwiecki D, Fleschman J, Bem J, Mayer R, Zinner M, Compton C. Sentinel Node Staging of Resectable Colon Cancer. *Ann Surg.* Oct 2004;240(4):624-630.
23. Bilchik AJ, Saha S, Wiese D, et al. Molecular staging of early colon cancer on the basis of sentinel node analysis: a multicenter phase II trial. *J Clin Oncol* 2001;19:1128-1136.
24. Bilchik AJ, Nora DT, Sobin LH, et al. Effect of lymphatic mapping on the new tumor-node-metastasis classification for colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:668-672.
25. Saha S, Dan AG, Berman B, et al. Lymphazurin 1% versus 99mTc sulfur colloid for lymphatic mapping in colorectal tumors: a comparative analysis. *Ann Surg Oncol.* 2004;11:21-26.
26. Saha S, Bilchik A, Wiese D, et al. Ultrastaging of colorectal cancer by sentinel lymph node mapping technique: a multicenter trial. *Ann Surg Oncol.* 2001;8(suppl):94S-98S.
27. Braat AE, Oosterhuis JW, Moll FC, Vries JE. Successful sentinel node identification in colon carcinoma using Patent Blue V. *Eur J Surg Oncol.* 2004;30:633-637.
28. Paramo JC, Summerall J, Poppiti R, Mesko TW. Validation of sentinel node mapping in patients with colon cancer. *Ann Surg Oncol* 2002;9:550-554.
29. Tsioulis GJ, Wood TF, Spirt M, Morton DL, Bilchik AJ. A novel lymphatic mapping technique to improve localization and staging of early colon cancer during laparoscopic colectomy. *Am Surg* 2002;68:561-565.
30. Van der Zaag ES, Bouma WH, Tanis PJ, Ubbink DT, Bemelman WA, Buskens CJ. Systematic review of sentinel lymph node mapping procedure in colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2012;19:3449-3459.
31. Saha S, Johnston G, Korant A, Shaik M, Kanaan M, Johnston R, Ganatra B, Kaushal S, Desai D, Mannam S.

- Aberrant drainage of sentinel lymph nodes in colon cancer and its impact on staging and extent of operation. *Am J Surg* 2013;205:302-305; discussion 302-305.
32. Retter SM, Herrmann G, Schiedeck TH. Clinical value of sentinel node mapping in carcinoma of the colon. *Colorectal Dis* 2011;13:855-859.
 33. Bilchik A, DiNome Maggie, Saha S, Turner R, Wiese D, McCarter M, Hoon D, Morton D. Prospectiv multicenter trial of staging adequacy in colon cancer. *Arch. Surg* 2006;141:527-34.
 34. Bilchik AJ, Giuliano AE, Essner R, et al. Universal application of intraoperative lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy in solid neoplasms. *Cancer J Sci Am* 1998;4:351-358.
 35. Saha S, Wiese D, Badin J, et al. Technical details of sentinel lymph node mapping in colorectal cancer and its impact on staging. *Ann Surg Oncol* 2000;7:120-124.
 36. Bilchik AJ, Nora DT, Sobin LH, et al. Effect of lymphatic mapping on the new tumor-node-metastasis classification for colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:668-672.
 37. Saha S, Seghal R, Patel M, et al. A multicenter trial of sentinel lymph node mapping in colorectal cancer: prognostic implications for nodal staging and recurrence. *Am J Surg* 2006;191:305-310.
 38. Bilchik AJ, Saha S, Tsioulis GJ, et al. Aberrant drainage and missed micrometastases: the value of lymphatic mapping and focused analysis of sentinel lymph nodes in gastrointestinal neoplasms. *Ann Surg Oncol* 2001;8:82-85.
 39. Read T, Fleshman JW, Caushaj PF. Sentinel lymph node mapping for adenocarcinoma of the colon does not improve staging accuracy. *Dis Colon Rectum* 2005;48:80-85.
 40. Fleig BW, Curley S, Lucci A, et al. A caution regarding lymphatic mapping in patients with colon cancer. *Am J Surg* 2001;182:707-712.
 41. Merrie AEH, van Rij AM, Phillips LV, et al. Diagnostic use of the sentinel node in colon cancer. *Dis Colon Rectum* 2001;44:410-417.
 42. Märkl B, Arnholdt HM, Jähnig H, Spatz H, Anthuber M, Oruzio DV, Kerwel TG. A new concept for the role of ex vivo sentinel lymph nodes in node-negative colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2010;17:2647-2655.
 43. Washington MK. Colorectal carcinoma: selected issues in pathologic examination and staging and determination of prognostic factors. *Arch Pathol Lab Med* 2008;132:1600-1607.
 44. Benson AB, Arnoletti JP, Bekaii-Saab T, Chan E, Chen YJ, Choti MA, Cooper HS, Dilawari RA, Engstrom PF, Enzinger PC, et al. Colon cancer *J Natl Compr Canc Netw* 2011;9:1238-1290.
 45. Benson AB, Bekaii-Saab T, Chan E, Chen YJ, Choti MA, Cooper HS, Engstrom PF, Enzinger PC, Fakih MG, Fuchs CS, et al. Rectal cancer. *J Natl Compr Canc Netw* 2012;10:1528-1564.
 46. Resch A, Langner C. Lymph node staging in colorectal cancer: Old controversies and recent advances. *World J Gastroenterol*. Dec 14, 2013;19(46):8515-8526.
 47. Rahbari NN, Bork U, Motschall E, Thorlund K, Büchler MW, Koch M, Weitz J. Molecular detection of tumor cells in regional lymph nodes is associated with disease recurrence and poor survival in node-negative colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol* 2012;30:60-70.
 48. Nordgård O, Oltedal S, Kørner H, Aasprong OG, Tjensvoll K, Gilje B, Heikkilä R. Quantitative RT-PCR detection of tumor cells in sentinel lymph nodes isolated from colon cancer patients with an ex vivo approach. *Ann Surg* 2009;249:602-607.
 49. Vather R, Sammour T, Kahokehr A, Connolly A, Hill A. Quantitative lymph node evaluation as an independent marker of long-term prognosis in stage III rectal cancer. *ANZ J Surg* 2011;81:883-888.
 50. Hyslop T, Waldman SA. Molecular staging of node negative patients with colorectal cancer. *J Cancer* 2013;4:193-199.
 51. Croner RS, Schellerer V, Demund H, Schildberg C, Papadopoulos T, Naschberger E, Stürzl M, Matzel KE, Hohenberger W, Schlabrakowski A. One step nucleic acid amplification (OSNA) - a new method for lymph node staging in colorectal carcinomas. *J Transl Med* 2010;8:83.
 52. Yamamoto H, Sekimoto M, Oya M, Yamamoto N, Konishi F, Sasaki J, Yamada S, Taniyama K, Tominaga H, Tsujimoto M, et al. OSNA-based novel molecular testing for lymph node metastases in colorectal cancer patients: results from a multicenter clinical performance study in Japan. *Ann Surg Oncol* 2011;18:1891-1898.
 53. Koyanagi K, Bilchik AJ, Saha S, Turner RR, Wiese D, McCarter M, Shen P, Deacon L, Elashoff D, Hoon DS. Prognostic relevance of occult nodal micrometastases and circulating tumor cells in colorectal cancer in a prospective multicenter trial. *Clin Cancer Res* 2008;14:7391-7396.
 54. Nicastrì DG, Doucette JT, Godfrey TE, Hughes SJ. Is occult lymph node disease in colorectal cancer patients clinically significant? A review of the relevant literature. *J Mol Diagn* 2007;9:563-571.
 55. Lotspeich E, Schoene M, Gerngross H, Schmidt R, Steinmann R, Ramadan M, Gansauge S. Detection of disseminated tumor cells in the lymph nodes of colorectal cancer patients using a real-time polymerase chain reaction assay. *Langenbecks Arch Surg* 2007;392:559-566.
 56. Ohlsson L, Hammarström ML, Israëlsson A, Näslund L, Oberg A, Lindmark G, Hammarström S. Biomarker selection for detection of occult tumour cells in lymph nodes of colorectal cancer patients using real-time quantitative RT-PCR. *Br J Cancer* 2006;95:218-225.
 57. Nordgård O, Oltedal S, Kørner H, Aasprong OG, Tjensvoll K, Gilje B, Heikkilä R. The potential of cytokeratin 20 and mucin 2 mRNA as metastasis markers in regional lymph nodes of colon cancer patients investigated by quantitative RT-PCR. *Int J Colorectal Dis* 2009;24:261-268.
 58. Conzelmann M, Dieterle CP, Linnemann U, Berger MR. Cytokeratin 20 and guanylyl cyclase C mRNA is largely present in lymph node and liver specimens of colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 2003;107:617-628.
 59. Lassmann S, Bauer M, Rosenberg R, Nekarda H, Soong R, Rürger R, Höfler H, Werner M. Identification of occult tumor cells in node negative lymph nodes of colorectal cancer patients by cytokeratin 20 gene and protein expression. *Int J Colorectal Dis* 2004;19:87-94.
 60. Tsouma A, Aggeli C, Pissimissis N, Lembessis P, Zografos GN, Koutsilieris M. Circulating tumor cells in colorectal cancer: detection methods and clinical significance. *Anticancer Res* 2008;28:3945-3960.
 61. Gunn J, McCall JL, Yun K, Wright PA. Detection of micrometastases in colorectal cancer patients by K19 and K20 reverse-transcription polymerase chain reaction. *Lab Invest* 1996;75:611-616.
 62. Bustin SA, Siddiqi S, Ahmed S, Hands R, Dorudi S. Quantification of cytokeratin 20, carcinoembryonic antigen and guanylyl cyclase C mRNA levels in lymph nodes may not predict treatment failure in colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 2004;108:412-417.