

CÁNCER DE MAMA DETECCIÓN DE CÉLULAS TUMORALES AISLADAS EN MÉDULA ÓSEA

RELACIÓN CON FACTORES PRONÓSTICOS

RENATA SÁNCHEZ¹, LUIS GONZÁLEZ², LUIS BETANCOURT², JUAN J. RODRÍGUEZ², ALEXIS SÁNCHEZ¹, DEMIÁN SPINETTI², DAVID PARADA³

¹ HOSPITAL UNIVERSITARIO DE CARACAS FACULTAD DE MEDICINA. UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA.

² INSTITUTO ONCOLÓGICO "DR. LUIS RAZETTI". ³ HOSPITAL "JOSE MARÍA VARGAS"

TRABAJO GANADOR PREMIO DR. VÍCTOR BRITO A. 2007

RESUMEN

OBJETIVO: La presencia de células tumorales en médula ósea en pacientes con cáncer de mama no metastático ha sido reportada en la literatura internacional, sin embargo, su valor pronóstico no está claro. El presente es el primer estudio nacional dirigido a determinar la incidencia de este hallazgo en nuestros pacientes y establecer su significado al relacionarlo con factores pronósticos conocidos. **MÉTODOS:** Se analizó la médula ósea de 40 pacientes con cáncer de mama no metastático que acudieron a la consulta de patología mamaria del Instituto Oncológico "Dr. Luis Razetti" entre enero de 2005 y abril de 2006. Las muestras fueron analizadas con hematoxilina - eosina e inmunohistoquímica con la aplicación de anticuerpos anticitoqueratina y se determinó la relación entre la presencia de células tumorales aisladas en médula ósea y los factores pronósticos conocidos. **RESULTADOS:** De las pacientes estudiadas, un 8 % presentaron células tumorales aisladas en médula ósea; y este hallazgo se relacionó desde el punto de vista estadístico con el tamaño tumoral, estadio de la enfermedad, estado de los receptores hormonales. Durante el seguimiento de estas pacientes no se evidenció recaída sistémica. **CONCLUSIONES:** En pacientes con cáncer de mama no metastático es posible detectar células tumorales aisladas en aspirados de médula ósea y este hallazgo parece estar relacionado con factores pronósticos conocidos. Sin embargo, el impacto de este nuevo elemento evaluado en el pronóstico de las pacientes y su utilidad en la toma de decisiones terapéuticas está por definirse.

PALABRAS CLAVE: Cáncer, mama, médula ósea, factores pronósticos.

Recibido: 29/06/2007

Revisado: 01/08/2007

Aceptado para publicación: 15/10/2007

SUMMARY

OBJECTIVES: The presence of isolated tumor cells in non metastatic breast cancer patients has been reported in the international literature, however its prognostic values is actually not clear. The present work is the first national report to determinate these find and his incidence in our patients, the objective was to determine the relationship between this isolated tumour cells and the knowing prognostic factors. **METHODS:** We analyzed the bone marrow of 40 patients with non metastatic breast cancer whom accede to the breast cancer department consult of the "Dr. Luis Razetti" Oncology Institute, between the years January 2005 and April 2006. The specimens were analyzed with hematoxylin-eosin and an immunohistochemistry with the application of the anticytokeratin antibodies and the determination of the relationship between the presence of isolated tumor cells and known prognostic factors was established. **RESULTS:** Of the studied patients the bone marrow study reported isolated tumour cells in 8 % of the patients and this finding was statistically related with the tumour size, the pathological stage and the hormonal receptors status. During the following time no systemic recurrence was reported in our patients. **CONCLUSIONS:** In patients with non metastatic breast cancer it is possible to detect isolated tumor cells in bone marrow and this finding seems to be related with some known prognostic factos, however the impact of this new element in the prognosis of the patients and its utility in the therapeutic decisions making needs to be defined.

KEY WORDS: Breast, cancer, bone marrow, prognostic factors.

Correspondencia: Dra. Renata Sánchez

Avenida Principal de Santa Sofía. Torre Alfa. Piso 9. Consultorio 9 C. El Cafetal, Caracas, Miranda. 1061.

Teléfono-Fax: 9856257 e-mail: rsm35@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

E

l carcinoma de mama es la causa más frecuente de muerte por cáncer en la mujer en países desarrollados y en Venezuela, igualmente ocupa los primeros lugares.

Durante las últimas décadas se han hecho esfuerzos para lograr una detección temprana del cáncer de mama. La introducción de la mamografía periódica en mujeres mayores de 40 años o mayores de 35 años si tienen factores de riesgo conocidos, ha permitido identificar tumores pequeños y con menos compromiso ganglionar, determinando de esta manera una disminución de la mortalidad^(1,2). Sin embargo, a pesar de la detección temprana de la enfermedad y de su tratamiento adecuado según los grupos de riesgo establecidos, hay cierto número de pacientes que presenta recaída sistémica durante el seguimiento.

En pacientes sin evidencia de enfermedad sistémica en el momento de la resección del tumor primario, se evalúan características clínicas y patológicas para establecer el estadio de la enfermedad. Con esta información y la incidencia porcentual de recaída conocida por análisis estadístico, se determina el riesgo de recurrencia, lo cual, permite decidir que pacientes deben recibir terapia adyuvante, con la finalidad de prevenir o disminuir la frecuencia de la misma⁽³⁻⁵⁾.

Tradicionalmente, se ha establecido que los factores pronósticos más importantes para recaída sistémica son el tamaño tumoral y el estado ganglionar, sin embargo, el valor predictivo de este último tiene sus limitaciones. Aproximadamente 60 % de los pacientes ganglios positivos y 25 % a 30 % de los ganglios negativos desarrollan recaída sistémica, por lo que debe existir algún otro factor que explique este comportamiento^(6,7).

El sistema de estadificación actual no

reconoce apropiadamente pacientes de alto riesgo con tumores pequeños y ganglios negativos. De allí surge la idea de estudiar algún otro elemento predictivo que permita identificar pacientes con alto riesgo de recaída^(8,9).

Es bien conocido que la recaída metastásica es causada por la diseminación sistémica de células tumorales, lo cual puede ser demostrado al evidenciar su presencia en médula ósea o inclusive en sangre periférica^(8,10). El tiempo necesario para que estas células tumorales proliferen es incierto, se cree que pueden permanecer en un estado silente por largos períodos hasta que son erradicadas por mecanismos inmunológicos o bien comienzan su crecimiento⁽³⁾.

Si bien, el estado ganglionar ha sido establecido como el factor pronóstico más importante para predecir el riesgo de recaída a distancia en pacientes con cáncer de mama, la presencia de células tumorales en médula ósea, pareciera aportar un elemento nuevo en la evaluación inicial de estos pacientes, sobre todo en estadios tempranos^(4,6,10).

Actualmente, la clasificación TNM, grado histológico, estado de los receptores hormonales y la edad, son utilizados como factores de valor pronóstico y constituyen la base para la toma de decisiones terapéuticas⁽⁵⁾. Sin embargo, estos factores, parecen no ser suficientes para asignar pacientes a grupos de bajo riesgo que no ameriten tratamiento sistémico, o de alto riesgo que sí se beneficien del mismo^(8,11).

El 80 % de los pacientes con cáncer de mama reciben quimioterapia adyuvante independientemente del estado de la médula ósea, por lo que la mayor utilidad de este nuevo factor pronóstico sería en algunos pacientes en estadios tempranos, que actualmente no tienen indicación de tratamiento adyuvante sino sólo locorregional^(4,8,11-13). Diel y col. demostraron en 1996 que en pacientes sin evidencia clínica de enfermedad metastásica, la positividad de médula ósea varía entre 16 % y 45 %; estando

alrededor de un 9,7 % en pacientes ganglios negativos y 20,3 % en pacientes ganglios positivos^(7,14).

La presencia de células tumorales aisladas en médula ósea en el momento de la cirugía, ha sido estudiada como elemento predictivo de recaída sistémica temprana en pacientes ganglios positivos y ganglios negativos, siendo los resultados en este último grupo controversiales^(8,9). Algunos estudios aseguran que la presencia de células tumorales aisladas en médula ósea debe ser considerada como un factor pronóstico independiente para predecir recaída sistémica y mortalidad por cáncer de mama^(7,8,13-15).

El objetivo de la terapia adyuvante es la erradicación de células tumorales ocultas, antes de que la enfermedad micro metastásica se haga clínicamente evidente, por lo tanto, su detección temprana en médula ósea, puede identificar pacientes que se beneficiarían de este tratamiento, y de esta manera obtendrían un impacto positivo en el pronóstico^(10,16). En estadios más tardíos, su identificación puede ser útil para determinar la presencia y cambios en el número de células malignas residuales, permitiendo que el tratamiento sea monitorizado y ajustado a las necesidades y respuesta del paciente⁽⁴⁾.

Se ha demostrado que la persistencia de células tumorales aisladas posterior al tratamiento adyuvante, se relaciona con un peor pronóstico, dado por una disminución de la sobrevida libre de enfermedad y de la sobrevida global^(10,16). Varios estudios han tratado de explicar por qué estas células presentan una menor respuesta a la terapia adyuvante, y se ha demostrado que se encuentran en la fase G0 del ciclo celular, es decir, en etapa no proliferativa, y esto aunado a una sobreexpresión del Her2neu, las hace más resistentes a los agentes citotóxicos comúnmente utilizados⁽¹⁰⁾. El conocimiento de esta situación, brinda la opción de intentar una segunda línea de tratamiento con mecanismos

de acción diferentes como es el caso de los anticuerpos monoclonales^(8,13).

A la fecha en Venezuela no se han publicado reportes relativos a la presencia de células tumorales aisladas en médula ósea de pacientes con cáncer de mama, el objetivo de este estudio es determinar la incidencia de este hallazgo y esclarecer el significado pronóstico al relacionarlo con otros factores conocidos.

MÉTODOS

Se estudiaron 40 pacientes con diagnóstico histológico de cáncer de mama, que acudieron a la consulta del servicio de patología mamaria del Instituto Oncológico "Dr. Luis Razetti" entre enero de 2005 y abril de 2006. Se sometieron a un examen físico riguroso y a la realización de estudios de extensión para descartar la presencia de enfermedad metastásica a distancia (pruebas de funcionalismo hepático, radiografía de tórax, ecosonograma abdominal y gammagrama óseo).

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Pacientes con carcinoma de mama metastático.
- Pacientes que recibieron o son candidatas a tratamiento neoadyuvante.
- Pacientes con antecedentes de otra neoplasia maligna.

Una vez seleccionadas las pacientes del estudio, se sometieron a tratamiento quirúrgico, que consistió en cirugía preservadora o mastectomía radical modificada tipo Madden, según las características de la mama y el tamaño de la lesión.

El estudio fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto Oncológico "Dr. Luis Razetti" y se obtuvo el consentimiento informado de todas las pacientes que cumplieron

con los criterios de inclusión.

PREPARACIÓN DE LA MÉDULA ÓSEA

Las pacientes que calificaron para tratamiento quirúrgico primario se les tomó bajo anestesia general, previo al acto quirúrgico planificado, 20 cm³ de aspirado de médula ósea de cada cresta ilíaca anterior.

Las muestras fueron procesadas de la siguiente manera: previo a fijación en formol al 10 % por un período de 24 horas, se procedió a incluir el material en su totalidad para estudio histológico e inmunohistoquímico convencional. Del material obtenido de parafina, se realizaron secciones entre 4 a 5 micras, las cuales, se colorearon con hematoxilina - eosina. Se valoraron 5 secciones histológicas para cada biopsia, tomándose en consideración para su análisis la presencia de serie hematopoyética, espículas óseas y otros elementos celulares (Figura 1).

El método inmunohistoquímico se llevó a cabo de la siguiente manera: del material obtenido de parafina se obtuvieron secciones entre 2 micras a 4 micras y se procedió a desparafinar e hidratar los cortes, para

inmediatamente realizar la recuperación antigénica con solución recuperadora de antígenos DAKO (S-1600) durante 30 minutos en una vaporera (Black&Decker®) a una temperatura de 95° C. La solución se dejó enfriar hasta llegar a temperatura ambiente, para después realizar la inhibición de la peroxidasa endógena con una solución de metanol y peróxido de hidrógeno al 3 %. Posteriormente, se realizaron tres lavados con solución tamponada de fosfato a pH 7,2 a 7,4 (PBS).

La incubación con el anticuerpo primario Queratina 7 (Cytokeratin 7, DAKO 1:50), se realizó por 30 minutos a temperatura ambiente. Después se lavó con PBS en tres ocasiones, para realizar la incubación con el anticuerpo secundario unido al polímero (LSAB DAKO). Finalmente, se revelaron con diaminobencidina para ser deshidratados y aclarados con alcoholes a concentraciones crecientes y xilol, respectivamente. Las secciones inmunohistoquímicas se valoraron con aumentos directos entre 4X a 40X, para evidenciar la presencia de células positivas, con positividad citoplasmática o en la membrana celular (Figura 2).

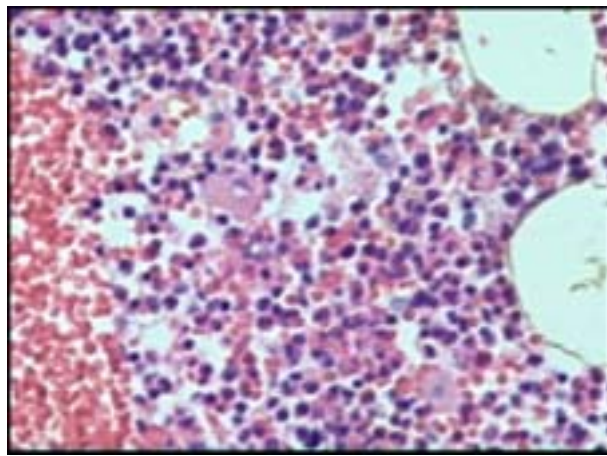
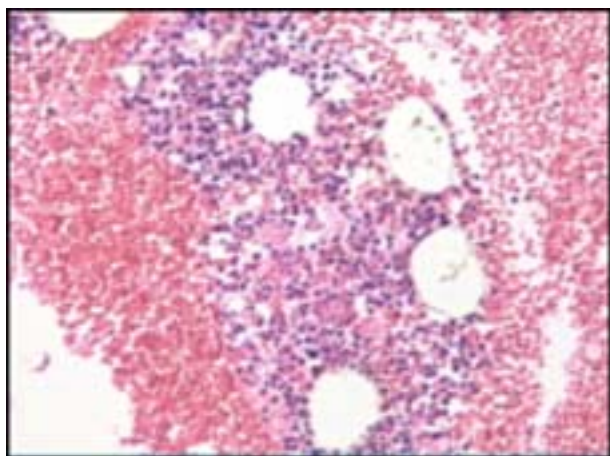


Figura 1. Tinción con hematoxilina – eosina de aspirado de médula ósea.

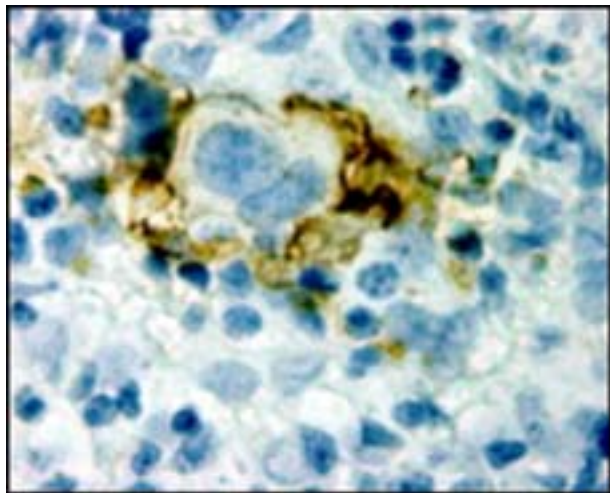


Figura 2. Inmunohistoquímica del aspirado de médula ósea. (CITOKERATIN 7)

ANÁLISIS DEL TUMOR PRIMARIO Y DE LOS GANGLIOS AXILARES

Se analizaron de manera usual, practicándose además análisis inmunohistoquímico del tumor primario para determinar el estado de los receptores hormonales y del Her2neu.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Una vez procesados los aspirados de médula ósea, se relacionaron los resultados obtenidos con los diferentes factores pronósticos ya conocidos para el cáncer de mama como: tamaño tumoral, estado ganglionar, estadio de la enfermedad, grado histológico, estado de los receptores hormonales, y expresión del Her-2-neu, mediante la aplicación de la prueba Chi cuadrado de independencia para las distintas variables en estudio. Se utilizó un programa computarizado conocido como Minitab®, obteniéndose para cada una de las pruebas, el estadístico Chi cuadrado y el valor crítico.

RESULTADOS

Se estudiaron un total de 40 pacientes que

acudieron a la consulta del servicio de mama del Instituto Oncológico "Dr. Luis Razetti" en el período establecido, con impresión diagnóstica de cáncer de mama estadios I, II, III.

La edad de las pacientes estudiadas estuvo comprendida entre los 27 y los 89 años de edad, encontrándose la mayoría (62 %) entre 41 y 60 años, siendo el 57 % posmenopáusicas.

El tipo histológico predominante fue el carcinoma ductal infiltrante (98 %) identificándose tres casos de variedad mucinosa, el resto correspondió al carcinoma lobulillar. Posterior al análisis anatomopatológico, el 72,5 % de los tumores fue clasificado como grado histológico G2 o G3 (Cuadro 1). El tratamiento quirúrgico consistió en cirugía preservadora en un 52 % o mastectomía radical modificada tipo Madden en un 48 %, lo cual se decidió según las características de la lesión y de la mama.

El 82,5 % de las pacientes se presentó con tumores T2 o T3 según la clasificación TNM. Un 62,5 % presentó ganglios axilares positivos y la mayoría fueron clasificadas como estadios patológicos I o II. (Cuadro 1).

Los receptores estrogénicos fueron positivos en un 63 % y los de progesterona en un 73 %. El Her-2-neu fue positivo en un 13 %.

CÉLULAS TUMORALES AISLADAS EN MÉDULA ÓSEA

De las 40 pacientes estudiadas se encontró la presencia de células tumorales aisladas en médula ósea en tres de ellas, lo cual representa un 8 %, en el 92 % de ellas fue negativo.

CÉLULAS TUMORALES AISLADAS EN MÉDULA ÓSEA Y RELACIÓN CON FACTORES PRONÓSTICOS

Al establecer la relación con los factores pronósticos estudiados, se evidenció que el 100 % de las pacientes con médula ósea positiva tenían lesiones mayores de 5 cm (T3), siendo esta relación estadísticamente significativa con un valor de significancia del 5 %.

Cuadro 1. Cáncer de mama: detección de células tumorales aisladas en médula ósea y su relación con factores pronósticos

Factores pronósticos	Pacientes	Células Tu en MO	Análisis estadístico
Tamaño tumoral	%		
T1	7(17,5)	0	S.-
T2	21(52,5)	0	
T3	12 (30)	3	
Ganglios linfáticos			
Negativos	15(37,5)	0	NS.-
Positivos	25 (62,5)	3	
Estadio patológico			
I	4 (10)	0	S.-
II	21 (52,5)	0	
III	15 (37,5)	3	
Grado histológico			
G1	11 (27,5)	0	NS.-
G2	20 (50)	2	
G3	9 (22,5)	1	
Receptores de progesterona			
Positivos	22 (55)	0	S.-
Negativos	18 (45)	3	
Her2neu			
Negativo	35 (87,5)	3	NS:-
Positivo	5(12,5)	0	

MO: médula ósea S: estadísticamente significativo $x^2 > VC$ NS. No se demostró relación estadísticamente significativa $x^2 < VC$

Asimismo, se evidenció que existe una relación entre la presencia de células tumorales en médula ósea y el estadio del cáncer según la clasificación TNM, correspondiendo la totalidad de los casos con aspirado positivo a pacientes con cáncer de mama localmente avanzado, relación esta que resulta igualmente significativa desde el punto de vista estadístico.

Al analizar el resto de los factores pronósticos y relacionarlos con la presencia de células tumorales en médula ósea, se evidenció que el 100 % de los pacientes con hallazgo de células tumorales en médula ósea en el aspirado tenían receptores de progesterona negativos, ganglios linfáticos positivos y Her-2-neu negativo. Sin embargo, con estos dos últimos factores no se demostró una relación estadísticamente

significativa.

En cuanto al grado histológico no hubo una distribución predominante de las pacientes con médula ósea positiva, presentándose la misma situación con los receptores de estrógeno, no demostrándose relación de dependencia entre dichas variables.

En un tiempo promedio de seguimiento de 18 meses (12-28 meses) no evidenciándose recaída sistémica en los controles sucesivos de las pacientes con presencia de células tumorales en médula ósea.

DISCUSIÓN

Los factores pronósticos son usados para

determinar el riesgo de desarrollar enfermedad a distancia y decidir la necesidad de terapia adyuvante sistémica. Específicamente en el cáncer de mama, el tamaño tumoral, estado ganglionar, la invasión vascular y los receptores hormonales, se han establecido como factores pronósticos, sin embargo, recientemente se han realizado numerosos estudios para tratar de incorporar algunos otros elementos que permitan identificar con mayor precisión grupos de riesgo para recaída de esta enfermedad⁽¹⁷⁾. Es así, como surge la posibilidad de incluir la detección de células tumorales aisladas en aspirados de médula ósea e incluso en sangre periférica como factor pronóstico independiente^(14,18).

En este estudio se aislaron células tumorales en la médula ósea de 3 de los pacientes estudiados, lo cual representa el 8 %. Desde 1983 diversos trabajos han sido publicados arrojando cifras de positividad en médula ósea que varían entre un 1 % por Mathieu y col.⁽¹⁹⁾ y un 48 % por Kirk y col.⁽²⁰⁾, los cuales representan resultados muy dispares, que han sido motivo de controversias.

Pantel y col.⁽²¹⁾ señalan, que la sensibilidad y especificidad de la detección por inmunohistoquímica de las células tumorales aisladas, está afectada por la diferente expresión antigénica, la cantidad de la muestra analizada y la técnica utilizada para la detección de la unión de los anticuerpos. De hecho, la Sociedad Internacional de Terapia Celular y el Instituto Nacional de Cáncer han reconocido la necesidad de estandarizar las técnicas de detección por inmunohistoquímica y sugieren que se utilicen los anticuerpos anticitoqueratina y se analicen por lo menos 2 por 10 6 células mononucleares obtenidas de dos sitios diferentes de aspiración^(10,22). Más recientemente, las sociedades de mastología de Austria, Alemania y Suiza han formado un panel de expertos para discutir los métodos existentes, estandarizar la técnica y estudiar las implicaciones clínicas⁽²³⁾.

El impacto clínico de la evaluación de la médula ósea en pacientes con cáncer de mama aún está debatido. Redding y col.⁽²⁴⁾ en 1983 publicaron por primera vez la importancia pronóstica de las células tumorales aisladas en médula ósea y a partir de entonces, se han reportado resultados disímiles en cuanto a la relación entre la presencia de estas células con los otros factores pronósticos ya conocidos⁽²⁵⁾.

Específicamente en este estudio al analizar la relación existente entre la presencia de células tumorales aisladas en médula ósea con factores pronósticos bien conocidos, se encontró que existe una relación estadísticamente significativa entre este hallazgo el tamaño tumoral, el estadio de la enfermedad y el estado de los receptores de progesterona. Estos resultados coinciden con otros estudios publicados como el de Diel y col.⁽¹⁴⁾, el cual encontró que la prevalencia de micro metástasis en médula ósea aumenta significativamente con el tamaño tumoral, el grado histológico y el estado de los receptores hormonales. Un metaanálisis que evaluó más de 4 000 pacientes de 8 centros europeos⁽²⁵⁾ logró establecer este nuevo elemento evaluado como un factor de mal pronóstico. Asimismo, Braun y col.⁽²⁶⁾ encontraron relación con el carcinoma de mama inflamatorio, el estado ganglionar y el tamaño tumoral.

Durante el seguimiento de los pacientes en estudio, no se evidenció recaída sistémica en aquellos que presentaban células tumorales aisladas en médula ósea, sin embargo, el tiempo de seguimiento ha sido relativamente corto. Actualmente se continúa con el protocolo de investigación y reportes futuros estarán dirigidos a determinar la relación de este controversial hallazgo con la recaída sistémica y sobrevida. Autores como Mansi y col.⁽²⁷⁾, durante un seguimiento de 6 años encontraron un aumento en la tasa de recaída tanto ósea como visceral y una disminución de la sobrevida global en aquellos pacientes con médula ósea positiva; hallazgos también corroborados en algunas otras publicaciones^(13,15,26,28). Otro aspecto importante

a considerar a pesar de que no fue evaluado en este estudio, es la utilidad de este nuevo factor pronóstico para decidir la necesidad de terapia adyuvante en pacientes con estadios tempranos que por los grupos de riesgo establecidos tradicionalmente, no tendrían indicación de tratamiento sistémico. Existen numerosas publicaciones al respecto con resultados inconclusos ^(10,12,29,30), aunque pareciera que debido al alto porcentaje de recaída sistémica incluso en los pacientes ganglios negativos, debería estandarizarse la utilización de células tumorales aisladas en médula ósea para determinar que grupo se beneficiaría de tratamiento sistémico. Por último, en aquellos pacientes a los que se les ha tomado una muestra de la médula ósea y ha resultado positiva, previo al inicio del tratamiento con quimioterapia, tendrían una referencia para documentar la persistencia o ausencia de dichas células durante su seguimiento y de alguna forma se evaluaría la eficacia del tratamiento aplicado y

la necesidad de iniciar un tratamiento de segunda línea. Numerosos estudios se están llevando a cabo al respecto aún sin conclusiones definitivas ^(8,13,16,18).

En pacientes con cáncer de mama no metastático, es posible detectar células tumorales aisladas en aspirados de médula ósea y este hallazgo está relacionado con factores pronósticos conocidos como son: el tamaño tumoral, el estadio de la enfermedad y el estado de los receptores hormonales. Sin embargo, el impacto y la significación de este nuevo elemento evaluado en el pronóstico de los pacientes y su utilidad en la toma de decisiones terapéuticas están por definirse.

AGRADECIMIENTOS: Al Banco de Drogas Antineoplásicas (BADAN) por el apoyo prestado para la elaboración del estudio al suministrar las agujas para el aspirado de médula ósea.

REFERENCIAS

1. Nystrom L, Rutqvist LE, Wall S, Lindgren A, Lindqvist M, Ryden S, et al. Breast cancer screening with mammography. Overview of Swedish randomized trials. *Lancet*. 1993;341:973-978.
2. Wang H, Káresen R, Hervik A, Thoresen S. Mammography screening in Norway: Results from the first screening round in four counties and cost effectiveness of a modeled nationwide screening. *Cancer Causes Control*. 2001;12:39-45.
3. Ozbas S, Dafydd H, Purushotham A. Bone marrow micrometastasis in breast cancer. *Br J Surg*. 2003;90:290-301.
4. Pantel K, Muller V, Auer M, Nausser N, Harbeck N, Braun S. Detection and clinical implications of early systemic tumor cell dissemination in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2003;9:6326-6334.
5. Pierga J, Bonneton C, Vincent-Salomon A, De Cremoux P, Nos C, Blin N, et al. Clinical significance of immunocytochemical detection of tumor cells using digital microscopy in peripheral blood and bone marrow of breast cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2004;10:1392-1400.
6. Trocciola S, Hoda S, Osborne M, Christos P, Levin H, Martins D, et al. Do bone marrow micrometastases correlate with sentinel lymph node metastases in breast cancer patients? *J Am Coll Surg*. 2005;200(5):720-725.
7. Wiedswang E, Borgen R, Karesen G, Kvalheim G, Nesland JM, Qvist E, et al. Detection of isolated tumor cells in bone marrow is an independent prognostic factor in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2003;21:3469-3478.
8. Braun S, Vogl F, Janni W, Marth C, Schilimok G, Pantel K, et al. Evaluation of bone marrow in breast cancer patients: Prediction of clinical outcome and response to therapy. *Breast*. 2003;12:397-404.

9. Gebauer G, Fehm T, Merkle E, Beck E, Long N, Jager W. Epithelial cells in bone marrow of breast cancer patients at time of primary surgery: Clinical outcome during long term follow up. *J Clin Oncol.* 2001;19(6):3669-3674.
10. Pantel K, Cote R, Fodstad O. Detection and clinical importance of micrometastatic disease. *J Natl Cancer Inst.* 1999;91:1113-1124.
11. Naume B, Borgen E, Kvalheim G, Káresen R, Qvist H, Sauer T, et al. Detection of isolated tumor cells in bone marrow in early stage breast carcinoma patients: Comparison with preoperative clinical parameters and primary tumor characteristics. *Clin Cancer Res.* 2001;7:4122-4129.
12. Braun S, Cevatli S, Assemi C, Janni W, Kantenich C, Schindbeck C, et al. Comparative analysis of micrometastasis to the bone marrow and lymph nodes of node-negative breast cancer patients receiving no adjuvant therapy. *J Clin Oncol.* 2001;19:1468-1475.
13. Janni W, Rack B, Schindbeck C, Strobl B, Rjosk D, Braun S, et al. The persistence of isolated tumor cells in bone marrow from patients with breast carcinoma predicts an increased risk for recurrence. *Cancer.* 2005;103(5):884-891.
14. Diel I, Kaufmann M, Costa S, Holle R, Von Minckwitz G, Solomayer E, et al. Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: Prognostic value in comparison with nodal status. *J Natl Cancer Institute.* 1996;88:1652-1658.
15. Wiedswang G, Borgen E, Káresen R, Qvist H, Janbu J, Kvalheim G, et al. Isolated tumor cells in bone marrow three years after diagnosis in disease free breast cancer patients predict unfavorable clinical outcome. *Clin Cancer Res.* 2004;10:5342-5348.
16. Braun S, Kantenich C, Janni W, Hepp F, De Waal J, Willgerath F, et al. Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high risk breast cancer patients. *J Clin Oncol.* 2000;18:80-86.
17. Diel IJ. Bone marrow staging for breast cancer: Is it better than axillaries node dissection?. *Semin Oncol.* 2001;28(3):236-244.
18. Wiedswang G, Borgen E, Schirmer C, Káresen R, Kvalheim G, Nesland J, et al. Comparison of the clinical significance of occult tumor cells in blood and bone marrow in breast cancer. *Int J Cancer.* 2006;118:2013-2019.
19. Mathieu MC, Friedman S, Bosa J, Caillou B, Spielmann M, Travagli JP, et al. Immunohistochemical staining of bone marrow biopsies for detection of occult metastases in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1990;15:21-26.
20. Kirk SJ, Cooper GG, Hoper M, Watt PC, Roy AP, Odling-Smee W. The prognostic significance of bone marrow micrometastases in women with early breast cancer. *Eur J Surg Oncol.* 1990;16:481-485.
21. Pantel K, Von Knebel D. Detection and clinical relevance of micrometastatic cancer cells. *Curr Opin Oncol.* 2000;12:95-101.
22. Borgen E, Naume B, Nesland J, Kvalheim G, Beiske K, Fodstad O, et al. Standarization of the immunocytochemical detection of cancer cells in bone marrow and blood. Establishment of objective criteria for the evaluation of immunostained cancer cells. *Cytometry.* 1999;1:377-388.
23. Fehm T, Braun S, Muller V, Janni W, Gebauer G, Marth C, et al. A concept for the standardized detection of disseminated tumor cells in bone marrow from patients with primary breast cancer and its clinical implementation. *Cancer.* 2006;107(5):885-892.
24. Redding WH, Coombs RC, Monaghan P, Clink HM, Imrie SF, Dearnaley DP, et al. Detection of micrometastases in patients with primary breast cancer. *Lancet.* 1983;ii:1271-1274.
25. Braun S, Vogl F, Schlimok G. Pooled analysis of prognostic impact of bone marrow micrometastases: 10 year survival 4268 breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2003;82(Suppl 1) [abstract 7].
26. Braun S, Pantel K, Muller P, Janni W, Hepp F, Kantenich C, et al. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N Engl J Med.* 2000;342:525-533.
27. Mansi J, Easton D, Berger U, Gazet J, Ford H, Bearnaley D, et al. Bone marrow micrometastases in primary breast cancer: Prognostic significance after 6 years follow-up. *Eur J Cancer.* 1991;27:1552-1555.
28. Cote R, Rosen P, Lesser M, Old L. Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult bone marrow micrometastases. *J Clin Oncol.* 1991;9:1749-1756.
29. Becker S, Becker-Pergola G, Wallwiener D, Solomayer EF, Fehm T. Detection of cytokeratin-positive cells in the bone marrow of the breast cancer patients undergoing adjuvant therapy. *Breast Cancer Res Treat.* 2006;97(1):91-96.
30. Subramanian DS, Isaacs C. Utilizing prognostic and predictive factors in breast cancer. *Curr Treat Options Oncol.* 2005;6(2):147-159.