

ORIGINAL

Estudio comparativo entre el método *One step nucleic acid amplification* y el método convencional en la estadificación en cáncer de mama: un aumento en la detección de micrometástasis



María López-Zambrano^{a,*}, Nuria Ruiz^{a,1}, Maria Teresa Soler^{a,c}, Maria Jesús Pla^b, Cecilia Quetglas^b, Javier Pérez-Martín^d, Anna Petit^a, Mar Varela^a, Laura Ferrazza^a, Ana M. Benítez^f, Eva Mancebo^a, Enric Condom^{a,e} y Xavier Matias-Guiu^a

^a Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitari de Bellvitge/IDIBELL, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, España

^b Servicio de Ginecología, Hospital Universitari de Bellvitge/IDIBELL, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, España

^c Unidad funcional de Mama, Institut Català d'Oncologia/IDIBELL, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, España

^d Unidad de Investigación Clínica, Institut Català d'Oncologia/IDIBELL, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, España

^e Unidad de Medicina Experimental, Universitat de Barcelona, Barcelona, España

^f Servicio de Medicina Nuclear, Hospital Universitari de Bellvitge/IDIBELL, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, España

Recibido el 5 de febrero de 2016; aceptado el 14 de junio de 2016

Disponible en Internet el 25 de octubre de 2016

PALABRAS CLAVE

Estadificación;
Ganglio centinela;
Cáncer mama;
One step nucleic acid amplification;
Carga tumoral;
Micrometástasis

Resumen

Objetivos: El método *One step nucleic acid amplification* (OSNA) se ha incorporado para el estudio del ganglio centinela (GC) en cáncer de mama como alternativa al estudio convencional histológico (MC).

El propósito de nuestro estudio fue comparar la estadificación por ganglio centinela (EGC) obtenida por el método OSNA con la obtenida mediante MC.

Material y métodos: Se seleccionaron pacientes con cáncer de mama y EGC recogidas durante los años 2009-2010 y 2012-2013, estudiadas con MC y método OSNA. Se analizaron diferentes parámetros clínico-patológicos.

Resultados: Se incluyó a 1.124 pacientes, 590 estudiadas por MC y 534 por método OSNA. La EGC inicial fue: pN0: MC 349 (59,2%) y OSNA 335 (62,7%); pN0(i+): MC 74 (12,5%) y OSNA 14 (2,6%); pN1mi: MC 59 (10%) y OSNA 77 (14,4%); pN1: MC 108 (18,3%) y OSNA 108 (20,3%). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la EGC por método OSNA y MC ($p < 0,001$), a expensas de las tasas de pN1mi y pN0(i+).

Se seleccionó a 224 pacientes con EGC pN1mi y pN0(i+) para determinar si las diferencias encontradas podrían atribuirse a distintas características clínico-patológicas. El método OSNA detecta el doble de micrometástasis (84,6%).

* Autor para correspondencia.

Correos electrónicos: mlopezz@bellvitgehospital.cat, delazambra@gmail.com (M. López-Zambrano).

¹ M. López-Zambrano y N. Ruiz contribuyeron de forma equitativa en la elaboración de este artículo.

KEYWORDS

Staging;
Sentinel node;
Breast cancer;
One step nucleic acid
amplification;
Tumour burden;
Micrometastases

Conclusiones: En nuestra casuística, por el método OSNA se observa un incremento significativo de pN1mi (84,6% vs. 44,4%) y una disminución de pN0(i+) respecto al estudio convencional, diferencias que no están condicionadas por los parámetros clínico-patológicos. El 75% de casos con pN1mi por OSNA muestra un número de copias inferior a 1.000.

© 2016 SESPM. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Comparative study of the One step nucleic acid amplification method and the conventional method in axillary staging in breast cancer: An increase in the detection of micrometastases

Abstract

Objetives: The "One Step Nucleic Acid Amplification" (OSNA) method has been incorporated in the study of the sentinel lymph node (SLN) in breast cancer as an alternative to conventional histological study.

The aim of our study was to compare sentinel lymph node staging (SLNS) obtained by the OSNA method with that obtained by the conventional method (CM).

Material and methods: We identified patients with breast cancer and SLN study during the periods 2009-2010 and 2012-2013, who underwent the CM and by OSNA. We analysed different clinicopathological parameters.

Results: A total of 1124 patients were studied, 590 by CM and 534 by OSNA. SLNS was: pN0: CM 349 (59.2%) and OSNA 335 (62.7%); pN0(i+): CM 74 (12.5%) and OSNA 14 (2.6%); pN1mi: CM 59 (10%) and OSNA 77 (14.4%); pN1: CM 108 (18.3%) and OSNA 108 (20.3%). Statistically significant differences were found between the SLNS by OSNA and CM ($p < 0.001$), due to the rates of pN1mi and pN0(i+).

To determine whether this statistical significance could be attributed to different clinicopathological features, 224 patients were selected from the initial series with SLN pN1mi and pN0(i+). In this subgroup, the OSNA method detected twice as many micrometastases (pN1mi) (84.6%).

Conclusions: In our series, the OSNA method resulted in a significant increase in pN1mi (84.6% vs 44.4%) and a decrease in pN0(i+) compared with the conventional method. Those differences were not affected by clinicopathological parameters. Most cases (75%) with pN1mi by OSNA showed less than 1000 copies.

© 2016 SESPM. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

El estado del ganglio centinela es el factor pronóstico más importante en las pacientes con cáncer de mama en estadios iniciales (axila clínicamente negativa)^{1,2} y su estudio conlleva además una disminución de la morbilidad asociada a la linfadenectomía axilar^{3,4}.

Las técnicas convencionales de estudio del ganglio centinela (citología, hematoxilina-eosina [H&E] e inmunohistoquímica) tienen limitaciones en la medición del volumen metastásico total puesto que no evalúan la totalidad del ganglio⁵. El estudio intraoperatorio convencional del ganglio centinela puede tener falsos negativos con respecto al estudio histológico definitivo^{6,7}.

Recientemente, se ha incorporado la utilización de técnicas de biología molecular para la detección de metástasis del ganglio centinela en cáncer de mama, utilizando citoqueratina 19 como marcador. El método *One step nucleic acid amplification* (OSNA) detecta y amplifica mediante la reacción en cadena de la polimerasa la presencia de ARNm de citoqueratina 19 en todo el ganglio. Este método ha sido validado y estandarizado en diversos estudios⁸⁻¹⁰. El

OSNA tiene numerosas ventajas: es un método rápido, semi-automatizado y estandarizado, que evalúa todo el ganglio y permite cuantificar el número de copias de ARNm¹¹. El estudio intraoperatorio mediante OSNA permite realizar la linfadenectomía si fuera precisa en el mismo acto quirúrgico, lo cual evita una segunda cirugía y permite iniciar antes el tratamiento adyuvante¹². Además, permite analizar más de un ganglio a la vez¹³ y reduce la carga laboral del patólogo⁷.

Actualmente, se considera que el método OSNA es una técnica con elevada sensibilidad, especificidad y reproducibilidad, que permite la estandarización del proceso diagnóstico del ganglio centinela, por lo que se considera la técnica de elección en dicho estudio¹⁴.

Pero se debe tener en cuenta que hay tumores de mama que no expresan citoqueratina 19 o son heterogéneos; en estos casos, algunos autores recomiendan estudio del ganglio centinela mediante métodos convencionales¹³.

Desde 2011 en nuestro centro utilizamos el método OSNA en el estudio del ganglio centinela, ya sea de forma intraoperatoria o en diferido, excepto en los tumores CK19 negativos o heterogéneos, considerándose como expresión

heterogénea a aquellos tumores cuya expresión de CK19 es menor del 100% y especificándose el porcentaje de positividad.

El propósito de nuestro estudio es comparar la estadificación del ganglio centinela (EGC) obtenido por el método OSNA con el obtenido mediante el método convencional (MC) (citología, H&E e inmunohistoquímica), así como la evaluación de la carga tumoral (número de copias de ARNm de citoqueratina 19) de los ganglios centinela metastásicos.

Material y métodos

Pacientes

Se estudió a pacientes con cáncer de mama tratadas en el Hospital de Bellvitge, recogidas entre los años 2009-2010 y 2012-2013, con estudio de ganglio centinela axilar. Se distribuyeron en 2 cohortes históricas según el método empleado para el estudio de ganglio centinela. Por un lado, pacientes con estudio por MC (citología, H&E e inmunohistoquímica) y, por otro lado, con estudio mediante método OSNA.

Los distintos parámetros clínico-patológicos analizados en los subgrupos pN1mi y pN0(i+) fueron: tipo de cirugía (mastectomía, tumorectomía, otros), subtipo histológico (ductal, lobulillar, mucinoso, papilar, metaplásico, intraductal, otros), grado histológico (grado 1, 2 y 3), invasión vascular, receptores de estrógeno y receptores de progesterona, índice de proliferación Ki67, estado de HER2, estadio pT, estado del estudio genético, estado menopáusico (premenopáusica, perimenopáusica, posmenopáusica) y tratamientos complementarios (no tratamiento, quimioterapia, hormonoterapia, quimioterapia + hormonoterapia).

Los receptores de estrógenos y progesterona se consideraron positivos si la expresión inmunohistoquímica era en $\geq 10\%$ de las células tumorales y negativos si era menor del 10%. HER2 se consideró positivo en los casos con expresión inmunohistoquímica 3+ o en los casos con expresión inmunohistoquímica 2+ y amplificación del oncogén por hibridación fluorescente in situ¹⁵. En otro orden, el punto de corte del índice de proliferación de Ki67 se estableció en $< 20\%$ o $\geq 20\%$.

Estudio de ganglio centinela por método *One step nucleic acid amplification*

En todos los casos se había evaluado inmunohistoquímicamente en la *core* biopsia la positividad para CK19 en el 100% de células neoplásicas. Se disecó el tejido adiposo periganglionar y se incluyó en su totalidad en parafina para estudio histológico. Los ganglios centinela fueron pesados y procesados en su totalidad mediante método OSNA. Dicho método consiste en la detección de mRNA de la CK19, mediante la tecnología RT-LAMP y la amplificación isotérmica. Las muestras se homogeneizaron usando un tampón de lisis LYNORHAG y se introdujeron en el sistema automatizado de detección en tiempo real RD-100i (Sysmex Corp., Hyogo, Japón). El número de copias de ARNm de CK19 se estimó a partir del tiempo en que la curva de amplificación de la muestra exhibe un crecimiento exponencial y se calcula a partir de una recta patrón.

Los resultados se visualizan en 4 categorías diferentes: macrometástasis (> 5.000 copias de ARNm de CK19) (++), micrometástasis (250-5.000 copias) (+), células aisladas (100-250 copias) y negativo (< 99 copias) (-), según las recomendaciones del fabricante⁸.

Para estudios comparativos, todas las pacientes fueron clasificadas según sus respectivas estadificaciones axilares, según la clasificación TNM¹⁶.

Estudio de ganglio centinela por método convencional

Para la evaluación intraoperatoria del ganglio centinela por MC, se separó el tejido adiposo y en un primer tiempo los ganglios fueron seccionados de manera seriada a lo largo de su eje menor a intervalos de 1-2 mm. Se realizaron 2 improntas citológicas, quedando representadas las dos caras de cada sección ganglionar. Las primeras improntas se secaron al aire y se tiñeron con tinción de Diff Quick. Las segundas improntas se fijaron inmediatamente 3 min en etanol al 95% y fueron teñidas con H&E. Las improntas fueron revisadas por un patólogo especialista en patología mamaria, un citotécnico certificado o un citopatólogo, en los casos dificultosos. Las categorías diagnósticas incluían si el ganglio centinela fue positivo o negativo, o bien si había presencia de celularidad atípica. El resultado del estudio peroperatorio se notificó con celeridad al equipo quirúrgico.

Después de concluir el diagnóstico peroperatorio, el ganglio centinela y el tejido adiposo residual fueron fijados con formol al 10%, procesados de forma habitual y finalmente incluidos en parafina en su totalidad. Se aplicó el protocolo de ganglio centinela vigente en aquel periodo (3 cortes teñidos con H&E cortados a intervalos de 150 μm , intercalados con 3 cortes teñidos con técnicas de inmunohistoquímica para citoqueratina AE1/AE3 [DAKO IR053/IS053]).

Después del análisis histológico se reportó el tamaño de la metástasis en su diámetro mayor y la estadificación pN según la clasificación TNM¹⁶. Según dicha clasificación, una medida de metástasis $< 0,2$ mm o < 200 células aisladas en secciones histológicas se corresponde con la categoría de células tumorales aisladas (pN0[i+]), si 0,2-2 mm o > 200 células con micrometástasis (pN1mi) y macrometástasis (pN1) si la metástasis es > 2 mm.

Análisis estadístico

El cálculo del tamaño muestral correspondió a todas las pacientes tratadas en el Hospital Universitari de Bellvitge entre los años 2009-2010 y 2012-2013.

La descripción de las variables categóricas o dicotómicas se realizó con el cálculo de las frecuencias absolutas y relativas. Las variables continuas se describieron mediante el cálculo de un valor central, media o mediana, y el rango de valores o intervalo de confianza del 95% correspondiente. Para las comparaciones entre las variables cualitativas utilizamos la prueba de la chi al cuadrado y para las comparaciones de variables continuas, el test t de Student. Todas las comparaciones entre grupos se realizaron mediante test a 2 colas y con nivel de significación del 5% (valor de $p < 0,05$). Todo el análisis estadístico se realizó con el programa SPSS.

Tabla 1 Análisis descriptivo inicial por métodos

	Método convencional(n = 590)	Método OSNA(n = 534)	Total(n = 1.124)	p valor
pN0	349 (59,2%)	335 (62,7%)	684 (60,9%)	< 0,001
pN0(i+)	74 (12,5%)	14 (2,6%)	88 (7,8%)	
pN1mi	59 (10%)	77 (14,4%)	136 (12,1%)	
pN1	108 (18,3%)	108 (20,3%)	216 (19,2%)	

Diferencias en la EGC según el método, a expensas de las tasas de pN1mi y pN0(i+).

Los valores resaltados en negrita ponen de manifiesto las diferencias entre ambos métodos, a expensas de los resultados del análisis estadístico en los subgrupos pN0(i+) y pN1mi.

Resultados

Primer análisis estadístico

A partir de las 1.124 pacientes iniciales se realizó un análisis descriptivo de los diferentes estadios pN (pN0, pN0[i+], pN1mi, pN1a) comparando la cohorte OSNA (534 pacientes) con la cohorte convencional (590 pacientes).

Los resultados se recogen en la [tabla 1](#). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) entre la EGC por método OSNA y MC, a expensas de las tasas de los subgrupos pN1mi y pN0(i+).

Segundo análisis estadístico

Para determinar si esta significación estadística podría atribuirse a las distintas características clínico-patológicas, se seleccionó, a partir de la serie inicial, a las 224 pacientes con EGC pN1mi y pN0(i+), 133 estudiadas por MC y 91 por OSNA. En dichos subgrupos se analizaron los parámetros clínico-patológicos, recogidos en la [tabla 2](#).

En este segundo análisis estadístico, el método OSNA detectaba el doble de micrometástasis (pN1mi) (84,6%), respecto al estudio convencional (44,4%). Mientras que el MC detectaba 3 veces más células tumorales aisladas (pN0[i+]) que el método OSNA (55,6% vs. 15,4%, respectivamente) ([tabla 3](#)).

Mediante análisis estadístico se demostró que las diferencias estadísticamente significativas halladas entre ambos métodos ($p < 0,001$) eran independientes de todas las variables clínico-patológicas, a excepción de la variable de subtipo histológico.

Así mismo, de la serie estudiada por OSNA también se valoraron la media y la mediana de la carga tumoral mayor y total de los ganglios centinela (número de copias de ARNm de citoqueratina 19) ([tabla 4](#)). En nuestra casuística, en el 75% de los casos con estadificación de ganglio centinela pN1mi, la carga tumoral mayor se encontraba por debajo de las 952,5 copias ([fig. 1](#))

Discusión

Diversos estudios de comparación entre ambos métodos muestran que el MC infraestima la estadificación ganglionar^{7,17,18}, siendo el método OSNA más preciso para la detección de metástasis ganglionares⁶.

Según estudios recientes, el método OSNA tiene mayor sensibilidad para la detección de micrometástasis, siendo

similar la proporción de macrometástasis entre ambos métodos^{7,17}. En un estudio español reciente de metodología similar al nuestro, se concluye que el método OSNA es más preciso para la detección de metástasis del ganglio centinela que el MC, encontrando una mayor incidencia global de metástasis en el grupo estudiado con método OSNA, pero sin hallar diferencias significativas entre macro y micrometástasis⁶.

No obstante, en un estudio en el que se evalúa el mismo ganglio mediante ambos métodos, se observa que el método OSNA detecta peor las células tumorales aisladas y las micrometástasis en comparación con el MC¹¹. Así mismo, otro estudio reporta que el método OSNA puede tener falsos negativos en cuanto a la detección de células aisladas tumorales¹⁹.

En nuestro estudio se observa un aumento significativo de casos diagnosticados de micrometástasis y una disminución de casos de células tumorales aisladas en el grupo de método OSNA con respecto al grupo de MC. Creemos que esto puede deberse a que el método OSNA evalúa el ganglio en su totalidad a diferencia del MC. De manera que una posible hipótesis sería que algunos casos diagnosticados como células tumorales aisladas por el MC pudieran ser clasificados como micrometástasis si se hubiese realizado el estudio por el método OSNA.

A pesar de estas diferencias, hay controversia en la relevancia clínica de la EGC. Se han publicado estudios a favor y en contra de linfadenectomía en células tumorales

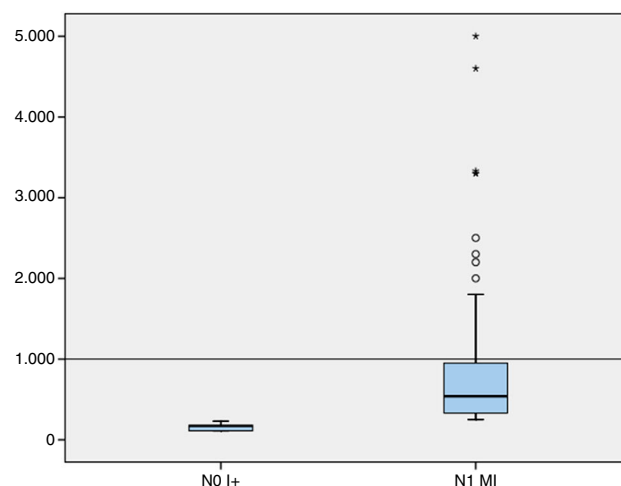


Figura 1 Distribución de la carga tumoral mayor de los GC en el subgrupo pN1mi (percentil 75 < 1.000 copias de RNAm de CK19) y pN0(i+).

Tabla 2 Parámetros clínico-patológicos analizados en los subgrupos pN1mi y pN0(i+)

Parámetro		Cohorte método convencional	Cohorte método OSNA	p valor
Población (n)		133 (59,4%)	91 (40,6%)	
Mediana edad (rango)		52 (26-83)	56 (30-75)	0,111
Tipo de cirugía	Tumorectomía	112 (84,2%)	70 (76,9%)	0,17
	Mastectomía	21 (15,8%)	21 (23,1%)	
Subtipo histológico	Ductal infiltrante	100 (75,2%)	54 (59,3%)	0,021
	Lobulillar infiltrante	17 (12,8%)	14 (15,4%)	
	Otros ^a	16 (12%)	23 (25,3%)	
Grado histológico (n = 209)	Grado 1	36 (27,9%)	26 (32,5%)	0,745
	Grado 2	51 (39,5%)	31 (38,8%)	
	Grado 3	42 (32,6%)	23 (28,8%)	
Invasión vascular	Presente	30 (22,6%)	18 (19,8%)	0,619
	Ausente	103 (77,4%)	73 (80,2%)	
Receptores de estrógeno (n = 222)	Negativos	20 (15,3%)	12 (13,2%)	0,664
	Positivos	111 (84,7%)	79 (86,8%)	
Receptores de progesterona (n = 222)	Negativos	35 (26,7%)	30 (33%)	0,314
	Positivos	96 (73,3%)	61 (67%)	
Índice de proliferación Ki67 (n = 215)	< 20%	70 (53,4%)	48 (57,1%)	0,594
	≥ 20%	61 (46,6%)	36 (42,9%)	
HER2 (n = 219)	Negativo	114 (87%)	71 (80,7%)	0,204
	Positivo/amplificado	17 (13%)	17 (19,3%)	
	Tx	4 (3%)	1 (1,1%)	
Estadio T (n = 221)	Tis	5 (3,8%)	6 (6,7%)	0,212
	T1a	5 (3,8%)	11 (12,4%)	
	T1b	18 (23,6%)	14 (15,7%)	
	T1c	63 (47,7%)	36 (40,4%)	
	T2	35 (26,5%)	20 (22,5%)	
	T3	2 (1,5%)	2 (1,1%)	
	T4	2 (1,5%)	2 (1,1%)	
Estudio genético	Sí	20 (15%)	20 (22%)	0,183
	No	113 (85%)	71 (78%)	
Estado menopáusico	Premenopausia	53 (40,2%)	29 (31,9%)	0,211
	Perimenopausia	10 (7,6%)	4 (4,4%)	
	Postmenopausia	69 (52,3%)	58 (63,7%)	
Tratamiento	Sin tratamiento	1 (0,8%)	3 (3,3%)	0,153
	Hormonoterapia	50 (37,6%)	44 (48,4%)	
	Quimioterapia	19 (14,3%)	9 (9,9%)	
	Quimioterapia + hormonoterapia	63 (47,4%)	35 (38,5%)	

En negrita, el único parámetro clínico-patológico que muestra diferencias entre ambos subgrupos.

^a Mucinoso, papilar, metaplásico, intraductal, otros.

aisladas y micrometástasis del ganglio centinela^{20,21}. En un estudio realizado en nuestro centro (por Pernas et al.) se concluyó que las pacientes con micrometástasis (N1mi) tratadas con quimioterapia sistémica y sin linfadenectomía no tenían recurrencia axilar, por lo que la linfadenectomía podría evitarse en estos casos²².

Las recomendaciones actuales de la 14th St. Gallen Breast Cancer Conference 2015 establecen que la presencia de micrometástasis en el ganglio centinela ya no se considera una indicación de vaciamiento ganglionar. Incluso, la linfadenectomía podría evitarse en casos de macrometástasis en pacientes con solo uno o 2 ganglios centinela positivos,

Tabla 3 Segundo análisis estadístico

	pN0(i+)	pN1mi	Total	p valor
Método OSNA	14 (15,4%)	77 (84,6%) ^a	91 (100%)	< 0,001
Método convencional	74 (55,6%) ^b	59 (44,4%)	133 (100%)	
Total	88 (39,3%)	136 (60,7%)	224 (100%)	

Análisis de los subgrupos pN1mi y pN0(i+) por el método.

^a El método OSNA detecta dos veces más micrometástasis que el método convencional.

^b El método convencional detecta tres veces más células aisladas que el método OSNA.

Tabla 4 Media y mediana de la carga tumoral mayor de los ganglios centinela de ambos subgrupos

	Carga tumoral mayor de los GC		
	Media	Mediana	p valor
pN0(i+)	162 (S: 44)	170 (R: 231-110)	< 0,001
pN1mi	908 (S: 956,6)	540 (R: 5.000-250)	

R: rango; S: desviación típica.

a quienes se les haya practicado cirugía de mama conservadora y hayan recibido posterior radioterapia y quimioterapia adyuvante²³. Por ello, algunos estudios concluyen que el estudio del ganglio centinela mediante OSNA proporciona un mejor indicador de la necesidad de linfadenectomía en el mismo acto quirúrgico ya que permite la evaluación intraoperatoria de todo el ganglio, pero no modifica el manejo terapéutico de las pacientes con cáncer de mama⁶.

En cuanto a la evaluación de la carga tumoral de las metástasis de los ganglios centinela, un estudio reciente demuestra que la carga tumoral total (definida como el sumatorio de la cantidad de copias de ARNm de CK19/ μ l de todos los ganglios centinela estudiados) es la mejor herramienta para predecir la probabilidad de tener más ganglios axilares metastásicos. A partir de 15.000 copias, aumenta la probabilidad de metástasis en otros ganglios axilares no centinela, siendo necesaria la linfadenectomía²⁴.

En el consenso de la SESPM se establece que el valor «carga tumoral» es más predictivo de afectación axilar que los grupos pronósticos definidos en el TNM (células tumorales aisladas, micrometástasis y macrometástasis)²⁵. Sobre la base de los estudios publicados, una carga tumoral total de 10.000-15.000 copias corresponde a una probabilidad de axila no afectada (libre de metástasis) de un 85%, mientras que el riesgo de enfermedad axilar residual para pacientes de bajo riesgo (según criterio histológico) es del 27%²⁵.

Dicho consenso recomienda el uso del criterio «carga tumoral» para la toma de decisiones quirúrgicas sobre la axila en los centros en que se utilice el sistema diagnóstico OSNA²⁵.

En nuestro estudio, la carga tumoral mayor del 75% de los casos con micrometástasis corresponde a < 1.000 copias (siendo el rango de micrometástasis de 250-5.000 copias de ARNm CK19/ μ l). Un número bajo de copias en las micrometástasis es un hallazgo relevante que no se encuentra reportado en la literatura. Creemos que sería conveniente contrastar estos resultados con los de otros centros, así como estudiar su significado clínico-patológico.

En cuanto al subtipo histológico de cáncer de mama, se han hallado diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,021$) entre ambos subgrupos (pN0(i+) y pN1mi) debido a un aumento de la categoría «otros» en la cohorte método OSNA (tabla 2). Creemos que estas diferencias podrían atribuirse a la implementación de la clasificación de la OMS de los tumores de mama del 2012²⁶ y a una subtipificación más exhaustiva en los diagnósticos de cáncer de mama de la cohorte método OSNA (realizados entre 2012 y 2013). A pesar de estas diferencias, y pese al sesgo inherente debido a comparar 2 series distintas de pacientes y no el mismo ganglio centinela, ambos grupos son homogéneos en cuanto al resto de variables clínico-patológicas.

En conclusión, en nuestra casuística, por el método OSNA se observa un incremento significativo de pN1mi (84,6% vs. 44,4%) y una disminución de pN0(i+) respecto al estudio convencional, diferencias que no están condicionadas por los parámetros clínico-patológicos. La mayoría de casos (75%) con pN1mi por OSNA muestra una carga tumoral baja con un número de copias inferior a 1.000.

Responsabilidades éticas

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes.

Financiación

La realización del análisis estadístico ha sido financiada económicamente por Sysmex Corp.

Autoría

María López-Zambrano y Nuria Ruiz contribuyeron igualmente en este trabajo.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Giuliano AE, Dale PS, Turner RR, Morton DL, Evans SW, Krasne DL. Improved axillary staging of breast cancer with sentinel lymphadenectomy. *Ann Surg.* 1995;222:394-401.
- Wilson LL, Giuliano AE. Sentinel lymph node mapping for primary breast cancer. *Curr Oncol.* 2005;12-7. Rep. 7.
- Verosini U, Paganelli G, Viale G, Galimberti V, Luini A, Zurrada S, et al. Sentinel lymph node biopsy and axillary dissection in breast cancer: Results in a large series. *J Natl Cancer Inst.* 1999;91:368-73.
- Posther KE, Wilke LG, Giuliano AE. Sentinel lymph node dissection and the current status of American trials on breast lymphatic mapping. *Semin Oncol.* 2004;31:426-36.
- Cserni G. Intraoperative analysis of sentinel lymph nodes in breast cancer by one step nucleic acid amplification. *J Clin Pathol.* 2012;65:193-9.
- Ruano MA, Lopez-Bonet E, Buxó M, Tuca-Rodríguez F, Vila-Camps E, Alvarez E, et al. An improved axillary staging system using the OSNA assay does not modify the therapeutic management of breast cancer patients. *Sci Rep.* 2014;4:5743.
- Santaballa A, de la Cueva H, Salvador C, García-Martínez AM, Guarín MJ, Lorente D, et al. Advantages of one step nucleic acid amplification (OSNA) whole node assay in sentinel lymph node (SLN) analysis in breast cancer. *SpringerPlus.* 2013;2:542.
- Tsujimoto M, Nakabayashi K, Yoshidome K, Kaneko T, Iwase T, Akiyama F, et al. One-step nucleic acid amplification for intraoperative detection of lymph node metastasis in breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2007;13:4807-16.
- Schem C, Maass N, Bauerschlag DO, Carstensen MH, Löning T, Roder C, et al. One-step nucleic acid amplification a molecular method for the detection of lymph node metastases in breast cancer patients; results of the German study group. *Virchows Arch.* 2009;454:203-10.

10. Feldman S, Krishnamurthy S, Gillanders W, Gittleman M, Beitsch PD, Young PR, et al. A novel automated assay for the rapid identification of metastatic breast carcinoma in sentinel lymph nodes. *Cancer*. 2011;117:2599–607.
11. Terada M, Niikura N, Tsuda B, Masuda S, Kumaki N, Tang X, et al. Comparative study of the one-step nucleic acid amplification assay and conventional histological examination for the detection of breast cancer sentinel lymph node metastases. *Tokai J Exp Clin Med*. 2014;39:122–7.
12. Guillen-Paredes MP, Carrasco-González L, Cháves-Benito A, Campillo-Soto A, Carrillo A, Aguayo-Albasini JL. One-step nucleic acid amplification (OSNA) assay for sentinel lymph node metastases as an alternative to conventional postoperative histology in breast cancer: Acost-benefit analysis. *Cir Esp*. 2011;89:456–62.
13. Brambilla T, Fiamengo B, Tinterri C, Testori A, Grassi MM, Sciarra A, et al. One-step nucleic acid amplification in breast cancer sentinel lymph node: A single institutional experience and a short review. *Front Med*. 2015;2:37.
14. Bernet L, Cano R, Martínez M, Dueñas B, Matias-Guiu X, Morell L, et al. Diagnosis of the sentinel lymph node in breast cancer: a reproducible molecular method: a multicentric Spanish study. *Histopathology*. 2011;58:863–9.
15. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007;25:25–30.
16. Singletary SE, Connolly JL. Staging manual breast cancer staging: Working with the sixth edition of the AJCC. *CA Cancer J Clin*. 2006;56:37–47.
17. Osako T, Iwase T, Kimura K, Yamashita K, Horii R, Yanagisawa A, et al. Intraoperative molecular assay for sentinel lymph node metastases in early stage breast cancer. A comparative analysis between one-step nucleic acid amplification whole node assay and routine frozen sections histology. *Cancer*. 2011;117:4365–74.
18. Tamaki Y, Sato N, Homma K, Takabatake D, Nishimura R, Tsujimoto M, et al. Routine clinical use of the one-step nucleic acid amplification assay for detection of sentinel lymph node metastases in breast cancer patients: results of a multicenter study in Japan. *Cancer*. 2012;118:3477–83.
19. Visser M, Jiwa M, Horstman A, Brink AA, Pol RP, van Diest P, et al. Intra-operative rapid diagnostic method based on CK19 mRNA expression for the detection of lymph node metastases in breast cancer. *Int J Cancer*. 2008;122:2562–7.
20. Tjan-Heijnen VC, Pepels MJ, de Boer M, Borm GF, van Dijk JA, van Deurzenet CH, et al. Impact of omission of completion axillary lymph node dissection (cALND) or axillary radiotherapy (ax RT) in breast cancer patients with micrometastases (pN1mi) or isolated tumor cells (pN0i+) in the sentinel lymph node (SN): Results from the MIRROR study. 2009 ASCO. *J Clin Oncol*. 2009;27, 18s. (suppl; abstr CRA506).
21. Giuliano AE, Hunt KK, Ballman KV, Beitsch PD, Whitworth PW, Blumencranz PW, et al. Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis. *JAMA*. 2011;305:569–75.
22. Pernas S, Gil M, Benítez A, Bajen MT, Climent F, Pla MJ, et al. Avoiding axillary treatment in sentinel lymph node micrometastases of breast cancer: A prospective analysis of axillary or distant recurrence. *Ann Surg Oncol*. 2010;17:17–20.
23. Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A, Gelber RD, Gnant M, Piccart-Gebhart M, et al. Tailoring therapies —improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer. *Ann Oncol*. 2015;8:1533–46.
24. Peg V, Espinosa-Bravo M, Vieites B, Vilardell F, Antúnez JR, de Salas MS, et al. Intraoperative molecular analysis of total tumor load in sentinel lymph node: A new predictor of axillary status in early breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;139:87–93.
25. Bernet L, Piñero A, Vidal-Sicart S, Peg V, Giménez J, Algara M, et al. Consenso sobre la biopsia selectiva del ganglio centinela en el cáncer de mama. Revisión de 2013 de la Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria. *Rev Esp Patol*. 2014;47:22–32.
26. Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ, editores. *WHO Classification of Tumours of the Breast*. 4th ed. Lyon: IARC Press; 2012.