

# MÉTODO DE AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDO NUCLEICO EN UN PASO EN EL GANGLIO CENTINELA DEL CÁNCER DE MAMA

DAVID PARADA D, PILAR HERNÁNDEZ

SERVEI DE PATOLOGIA HOSPITAL UNIVERSITARI SANT JOAN DE REUS, INSTITUT D'INVESTIGACIÓ SANITARIA PERE VIRGILI (IISPV), UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILL, EPIDEMIOLOGIA, ESTADÍSTICA Y BIOINFORMÁTICA, INSTITUT D'INVESTIGACIONS SANITÀRIES PERE VIRGILI, (IISPV). REUS-TARRAGONA, ESPAÑA

## RESUMEN

**OBJETIVO:** En este trabajo estudiamos las características clínico-patológicas en pacientes con diagnóstico de cáncer de mama a las que se les practicó el estudio del ganglio centinela por medio del método de amplificación de ácido nucleico en un paso. **MÉTODO:** Pacientes con carcinoma de mama estadio Tis-T2N0M0 fueron escogidas para el estudio. El estudio completo del ganglio centinela fue llevado a cabo intra-operatoriamente con el método de OSNA. Para las pacientes quienes fueron a disección ganglionar, los ganglios no centinelas fueron examinados con estudio patológico de rutina. **RESULTADOS:** 139 biopsias de ganglio centinela de 72 pacientes se analizaron. Las metástasis fueron detectadas con mayor sensibilidad por el método de OSNA que por el estudio citológico. Las pacientes quienes tuvieron metástasis en el centinela por el método de OSNA, presentaron un riesgo de metástasis a los ganglios linfáticos de la disección axilar de un 35 %. El riesgo de metástasis a ganglios linfáticos no centinelas fue significativamente bajo en los centinelas con micrometástasis en comparación en los que el ganglio centinela tenía macrometástasis. **CONCLUSIÓN:** El método de OSNA puede ser utilizado en la rutina clínica para el ganglio centinela, y su capacidad para determinar el volumen tumoral de la metástasis pudiera ser un poderoso factor predictivo para la metástasis a ganglios no centinelas. Estudios posteriores con mayor número de pacientes son necesarios para confirmar la utilidad de esta prueba para la selección clínica de pacientes que no necesitarían de disección axilar.

**PALABRAS CLAVE:** Ganglio centinela, OSNA, cáncer, mama, metástasis

## SUMMARY

**OBJECTIVE:** The objective of this study was to confirm the reliability and the usefulness of the one step nucleic acid amplification assay in routine clinical use for sentinel lymph node biopsy of breast cancer patients. **METHODS:** The patients with diagnostic of Tis-T2N0M0 breast cancer who underwent comprised the study cohort. A whole sentinel lymph node was examined intra-operatively with the assay. For the patients who underwent axillary dissection, non-sentinel nodes were examined with the routine pathologic examination. **RESULTS:** In total, 139 biopsy of sentinel node from 72 patients were analyzed. Sentinel lymphatic nodes metastases were detected with greater sensitivity by the OSNA assay than by pathologic examination, as expected from the difference in the size of the specimens examined. Patients who had sentinel node metastases assessed with the OSNA assay proved to harbour non-sentinel node metastases with an overall risk ratio of 35 %. The risk of non-sentinel node metastases was significantly lower for the patients who had positive sentinel nodes assessed as micrometastases than for those who had sentinel nodes assessed as macrometastases. **CONCLUSIONS:** In this work we conclude that the OSNA assay can be used for the routine clinical sentinel node, and its assessment for the volume of metastasis may be a powerful predictive factor for non-sentinel node biopsy metastasis. Further studies with more patients are needed to confirm the usefulness of this assay for selection in the clinical setting of patients who do not need axillary dissection.

**KEY WORDS:** Sentinel lymph node, OSNA, cancer, breast, metastasis.

---

Recibido: 25 de julio 2013 Revisado: 28/11/2013

Aceptado para publicación: 03/02/2014

Correspondencia: Dr. David Parada D .Servei de Patologia, Hospital Universitari Sant Joan de Reus.

---



---

Reus. 43206 Tarragona. España Teléfono: +34

977308517. Fax: +349773 77 56.

E-mail: dparada@grupsgassa.com.

---

## INTRODUCCIÓN

**L**a biopsia del ganglio centinela (GC) durante el acto operatorio se ha convertido en un procedimiento estándar en el tratamiento del cáncer de mama <sup>(1-10)</sup>. La utilidad de este método se basa en su capacidad para predecir la presencia de metástasis en el resto de los ganglios linfáticos axilares con elevada precisión. Así este recurso evitaría las disecciones ganglionares innecesarias, así como la morbilidad relacionada con el vaciamiento axilar.

Para el análisis durante el acto operatorio del GC, se realizan procedimientos convencionales de anatomía patológica que incluyen la valoración de secciones histopatológicas congeladas y teñidas con Hematoxilina-Eosina (HE), o el estudio de preparaciones citológicas efectuadas por aposición/raspado del material remitido; ambos procedimientos, complementados con el estudio histopatológico definitivo <sup>(2,7-9,12)</sup>. Sin embargo, es importante resaltar que la tasa de resultados falsos negativos utilizando métodos de estudio intraoperatorio con HE varía entre un 5 % y un 52 % <sup>(13)</sup>. Adicionalmente, los resultados de estos estudios aportan datos subjetivos y no objetivos, los cuales pueden diferir entre patólogos <sup>(14)</sup>. Inclusive en determinadas ocasiones, puede ser complicado asignar el estadio ganglionar (pN) adecuado al paciente, como por ejemplo cuando en un ganglio linfático existen varios grupos de células metastásicas o patrones dispersos de metástasis.

Debido a lo anterior, se han intentado desarrollar métodos intra-operatorios que proporcionen diagnósticos precisos, permitiendo llevar a cabo disecciones ganglionares en las pacientes que lo ameriten, evitando las cirugías en un segundo tiempo, el estrés para la paciente y el costo hospitalario <sup>(2,15,16)</sup>. Un procedimiento implementado con esta finalidad es el método de *OSNA* (del inglés, *one-step nucleic acid*

*amplification*) el cual permite la detección de células tumorales en el GC, basándose en una RT-LAMP (*reverse transcription loop-mediated isothermal amplification*), que consiste en transcripción reversa del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de la citoqueratina 19 (CK19). De esta forma, el método *OSNA* mide de forma cuantitativa el ARNm de la CK-19 existente en el ganglio centinela. Dicho ARNm de CK-19 se utiliza como marcador en el cáncer de mama debido a su alta expresión en células tumorales y baja presencia en las células normales del ganglio linfático <sup>(17)</sup>.

El presente estudio tiene como finalidad analizar las características clínico-patológicas de un grupo de pacientes con carcinoma de la glándula mamaria a las que se les realizó estudio del GC mediante el método de amplificación de ácido nucleico en un paso. Asimismo, se analizan las ventajas y desventajas en la implementación de este método.

## MÉTODO

Para el presente estudio se incluyeron todas las pacientes intervenidas por carcinoma de glándula mamaria y que en el acto operatorio se realizó el estudio del GC mediante el método de *OSNA* <sup>(11)</sup>, durante el período de febrero de 2011 a febrero de 2012. Previo a la sección del (los) ganglio(s) por el método *OSNA*, se realizaron dos citologías por aposición las cuales fueron teñidas por la tinción convencional de Papanicolaou o H-E, para su evolución simultánea. Para el procedimiento de *OSNA* se establecieron los siguientes valores como puntos de referencia de acuerdo a estudios previos de validación <sup>(11,17,18)</sup>

1. Macrometástasis, si la cuantificación de ARNm era mayor de  $5 \times 10^3$  copias ARN/ $\mu$ L.
2. Micrometástasis, si la cantidad de ARNm era entre  $2,5 \times 10^2$  y  $5 \times 10^3$  copias ARN/ $\mu$ L.
3. Negativo para metástasis cuando la cantidad de ARNm era menor de  $2,5 \times 10^2$  copias de

ARN/ $\mu$ L. Los criterios de inclusión para la realización del estudio intra-operatorio del ganglio centinela fueron aprobados por el comité de patología mamaria de nuestro centro e incluyeron: pacientes con estadios clínicos Tis extensos, T1/2N0M0 con axila, clínica y ecosonográficamente, negativa.

Durante el período de estudio se obtuvo un total de 72 pacientes. A partir de las historias clínicas y de los informes de anatomía patológica se consideraron variables de interés adicionales para el análisis como: la edad, el tamaño tumoral, el tipo y grado histológico, los receptores hormonales, la expresión de oncoproteína HER2/Neu utilizando el método de Herceptest, el índice de proliferación celular mediante la expresión nuclear de Ki-67 por inmunohistoquímica, el tratamiento previo y la disección ganglionar axilar, entre otras. En los casos en los cuales el estudio para Herceptest fue informado como 2+, se realizó la prueba de CISH para investigar la amplificación genética.

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó mediante frecuencias relativas y absolutas, así como con la prueba de Kolmogorov-Smirnov para determinar si la muestra podía seguir una distribución normal ( $P < 0,05$  no muestra distribución normal). Para el análisis de las relaciones univariadas y diferencias entre ellas se utilizaron las pruebas de Chi-cuadrado, Kruskal-Wallis y de Mann-Whitney. Un valor de  $P$  menor de 0,05 en cada una de las pruebas fue considerado como con diferencia estadísticamente significativa. Finalmente, para establecer el riesgo asociado a metástasis según la cuantificación de CK19 o diagnóstico de macrometástasis/micrometástasis se realizó una prueba de regresión logística para cada modelo.

## RESULTADOS

### HALLAZGOS CLÍNICOS

Las 72 pacientes estudiadas presentaron edades comprendidas entre los 38 y 85 años (Media: 58,12). Los estadios patológicos tumorales más frecuentes fueron el pT1c con 26 casos (36,62 %), seguido por el pT2 con 22 (30,99 %). Cinco (7,04 %) pacientes fueron categorizadas como Tis. Cinco pacientes recibieron tratamiento previo a la cirugía, con dos respuestas completas, dos parciales y un caso en el que no se evidenció respuesta al tratamiento. En el caso de la respuesta completa no se pudo definir el estadio patológico.

### HALLAZGOS HISTOPATOLÓGICOS

El tipo histológico más frecuente fue el carcinoma ductal infiltrante en 62 pacientes (87,32 %), seguido por el carcinoma lobulillar en 5 casos (7,04 %). El grado histológico II se evidenció en 33 casos (46,48 %). El 87,52 % expresaron receptores de estrógeno y 83,33 % fueron receptores de progesterona positivos. Desde el punto de vista inmunohistoquímico 4 pacientes (5,55 %) fueron triple negativas (RE, RP y HER2/neu, negativos). La expresión de oncoproteína HER2/Neu fue negativa (0 o 1+) en 48 casos (76,19 %) y positiva (3+) en 4 pacientes (6,35 %). En once pacientes (11,46 %) el HER2/neu fue interpretado como 2+, no demostrándose amplificación mediante el CISH. De estos once pacientes, cuatro fueron monosomías (Cuadro 1).

### HALLAZGOS DEL GANGLIO CENTINELA POR EL MÉTODO DE OSNA

De las 72 pacientes, se estudiaron un total de 139 ganglios linfáticos axilares, referidos como centinela, con una media de 1,93 ganglio/paciente. En 34 pacientes se analizó un ganglio, 19 con dos ganglios, 10 con tres, 6 con cuatro y 2 con cinco ganglios. En 42 (58,33 %) pacientes el resultado del ganglio centinela fue negativo. Se detectaron 16 (22,22 %) pacientes con micrometástasis y 14 (19,44 %) con macrometástasis (Figura 1). A las pacientes con diagnóstico de micro y macrometástasis se

		N	%
<b>ESTADIO PATOL.</b>	NA	1	1,41
	T1a	4	5,63
	T1b	9	12,63
	T1c	26	36,62
	T2	22	30,99
	T3	2	2,82
	Tis	5	7,04
	Tmic	2	2,82
<b>TIPO HISTOL.</b>	Dutual	62	87,32
	Lobulillar	5	7,04
	Medular	1	1,41
	Micropapilar	1	1,41
	Mucinoso/papilar	2	2,82
	Papilar inv	1	1,41
<b>GRADO HISTOL.</b>	1	4	5,63
	2	33	46,48
	3	13	18,31
	alto	3	4,23
	intermedio	1	1,41
	NA	17	23,94
<b>HERCEP TEST</b>	0	14	22,22
	1	34	53,97
	2	11	17,46
	3	4	6,35
<b>CISH</b>	NA	10	14,71
	0	58	85,29
<b>SOMIAS</b>	MONO	4	5,88
	0	64	94,12
<b>OSNA RESULT.</b>	0	42	58,33
	MICRO	16	22,22
	MACRO	14	19,44
<b>MACRO vs MICRO</b>	MACRO	14	46,67
	MICRO	16	53,33
<b>VACIAMIENTO</b>	Si	31	43,06
	No	41	56,94

NA= No aplica.

**Cuadro 1.** Características clínico-patológicas en pacientes con carcinoma de mama y ganglio centinela procesado por el método de OSNA (N=72). Febrero 2010-febrero 2011.

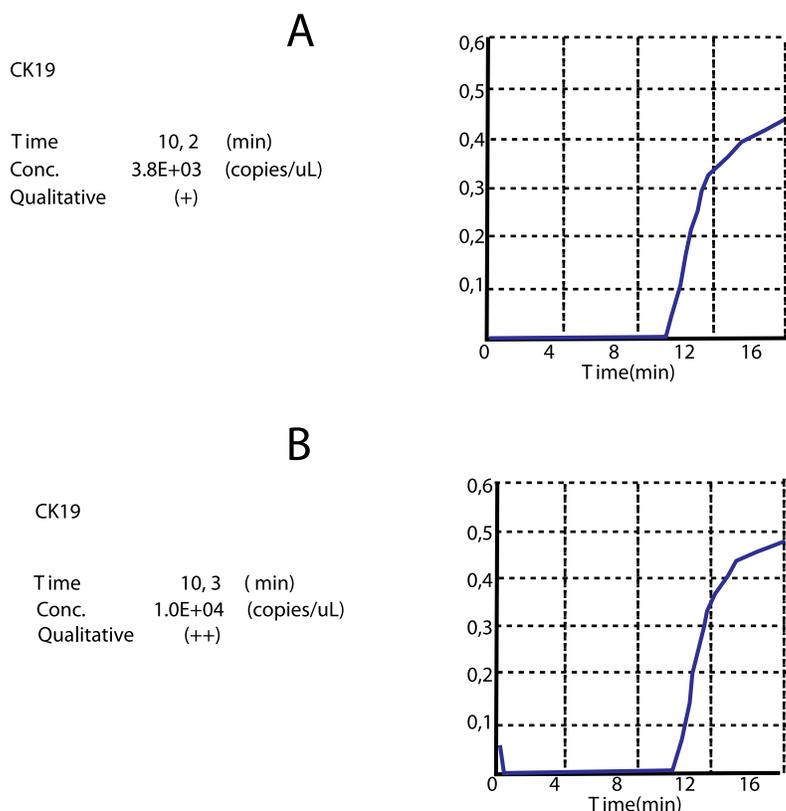


Figura 1. Resultados de dos pacientes mediante el método de OSNA para determinación de citoqueratina 19 (CK19). A. Caso con micrometástasis (+) cuya cuantificación fue 3,8E+03 copias/uL. B. Caso con macrometástasis (++) con valor de 1,0E+04 copias/uL. En cada uno de los casos se muestra la curva de progresión de la reacción en tiempo real.

les practicó disección ganglionar axilar, el cual generalmente incluía los niveles I y II.

En las treinta pacientes a las que se les practicó la disección ganglionar axilar, se obtuvieron entre 4 y 37 ganglios (Media: 18,35). En 20 pacientes no se observaron ganglios linfáticos metastáticos adicionales, mientras que en 10 pacientes la disección ganglionar axilar mostró al menos un ganglio positivo (la presencia de metástasis varió entre 1 y 7 ganglios). De las 16 pacientes con diagnóstico de micrometástasis, una (6,25 %) presentó un ganglio positivo en la disección ganglionar, en las restantes 15 (93,75 %) no se evidenciaron metástasis en

los ganglios estudiados. En las pacientes con diagnóstico de macrometástasis (14 pacientes), diez (71,43 %) de ellas se confirmó la presencia de metástasis en la disección ganglionar axilar. Cuando se estudió la correlación entre el estudio citológico se pudo evidenciar que el mismo falló en la detección de micrometástasis en el 100 % de los casos (0/16); mientras que en 78,57 % de las pacientes con diagnóstico de macrometástasis se detectó por medio del estudio citológico (11/14). No se evidenció correlación estadística con la presencia de micro/macrometástasis y las variables clínico/patológicas evaluadas.

## DISCUSIÓN

El estudio del GC en pacientes con carcinoma de glándula mamaria es una herramienta imprescindible. Sin embargo, su valoración intra-operatoria es limitada, con una precisión diagnóstica variable. Esto impone el análisis de los ganglios con protocolos histopatológicos en parafina específicos; lo cual, en el caso de que se logre demostrar patología metastásica, llevaría a procedimientos quirúrgico adicionales<sup>(19)</sup>.

Con la finalidad de mejorar la detección de enfermedad metastásica en el GC, diferentes procedimientos se han llevado a cabo, dentro de los cuales se pueden mencionar: secciones múltiples del material congelado<sup>(20)</sup> e inmunohistoquímica rápida tanto en citologías intra-operatorias<sup>(21,22)</sup> como en cortes congelados<sup>(23-25)</sup>. Un método alternativo para el estudio del GC son las pruebas moleculares<sup>(11,26)</sup>. En el presente estudio se utilizó el método de *OSNA* para el análisis de 72 pacientes con cáncer de mama, de las cuales el 56,88 % no se demostró metástasis y el 43,12 % tuvo expresión cuantitativa para la citoqueratina 19, considerándose por ello el diagnóstico de metástasis. Estos resultados difieren de los evidenciados por otro grupo, en el cual en 35 pacientes analizadas por el mismo método, el 82,86 % fue negativo para metástasis, mientras que el restante 17,14 % fue positivo para enfermedad metastásica<sup>(27)</sup>. Aunque en la mayoría de los estudios de *OSNA* no se analiza este dato, esta discrepancia pudiera deberse a diferencias en los criterios de inclusión de las pacientes.

En un reciente estudio multicéntrico desarrollado por el grupo japonés de *OSNA*<sup>(28)</sup>, se demostró que la sensibilidad para detectar metástasis en los GC fue mayor para el método del *OSNA* que para el examen patológico. Nuestros resultados demostraron hallazgos similares en cuanto a la capacidad diagnóstica del ganglio centinela, sobre todo si tomamos en consideración el diagnóstico de micro o macrometástasis. Es

indudable, que la detección de volúmenes tumorales menores requiere un muestreo exhaustivo y total para su detección, situación que durante el acto operatorio es prácticamente imposible, por medios convencionales. Otro aspecto interesante del trabajo japonés, fue el riesgo relativo de metástasis al resto de los ganglios de la disección axilar el cual se ubicó en un 33,7 %<sup>(28)</sup>. Por último, tal y como fue evidenciado en el presente estudio, el riesgo de metástasis a la disección ganglionar fue significativamente bajo en las pacientes con diagnóstico de micrometástasis comparado con aquellas pacientes con positividad para macrometástasis por *OSNA*. Hallazgos similares han sido descritos recientemente con diferencia significativa entre el diagnóstico de micro/macrometástasis<sup>(28)</sup>.

El método *OSNA* tiene una serie de ventajas, como son: elevada sensibilidad y especificidad diagnósticas; rapidez (tiempo promedio de evaluación de un ganglio centinela completo entre 20 a 30 min); automatización; eficacia costo/efectividad (todo en un procedimiento); evita re-intervenciones; no necesita condiciones estériles ni altas temperaturas para la desnaturalización e hibridación de las cadenas de ácidos nucleicos. Apesar de todas estas ventajas, la implementación por parte de un servicio de anatomía patológica de este método puede ser complicada porque requiere un espacio reservado para las máquinas de procesamiento, costo elevado de reactivos y materiales (165 €/ganglio), congelador a -80 °C para almacenar las muestras evaluadas, personal cualificado y que no pudiera ser realizado en los tumores sin expresión de citoqueratina 19.

En conclusión, el método *OSNA* es una técnica, con una alta sensibilidad y especificidad diagnósticas, de poco tiempo de duración, y que permite un análisis cuantitativo y no-observador dependiente de las metástasis ganglionares.

## REFERENCIAS

1. Donegan WL. Tumor-related prognostic factors for breast cancer. *CA Cancer J Clin.* 1997;47(1):28-51.
2. van Diest PJ, Peterse HL, Borgstein PJ, Hoekstra O, Meijer CJ. Pathological investigation of sentinel lymph nodes. *Eur J Nucl Med.* 1999;26(4 Suppl):43-49.
3. Weaver DL, Krag DN, Ashikaga T, Harlow SP, O'Connell M. Pathologic analysis of sentinel and non-sentinel lymph nodes in breast carcinoma: A multicentre study. *Cancer.* 2000;88(5):1099-1107.
4. Sabel MS, Zhang P, Barnwell JM, Winston JS, Hurd TC, Edge SB. Accuracy of sentinel node biopsy in predicting nodal status in patients with breast carcinoma. *J Surg Oncol.* 2001;77(4):243-246.
5. Stitzenberg KB, Calvo BF, Iacocca MV, Neelon BH, Sansbury LB, Dressler LG, et al. Cytokeratin immunohistochemistry validation of the sentinel node hypothesis in patients with breast cancer. *Am J Clin Pathol.* 2002;117(5):729-737.
6. Luini A, Gatti G, Ballardini B, Zurrada S, Galimberti V, Veronesi P, et al. Development of axillary surgery in breast cancer. *Ann Oncol.* 2005;168(2):259-262.
7. Cote RJ, Peterson HF, Chaiwun B, Gelber RD, Goldhirsch A, Castiglione-Gertsch M, et al. Role of immunohistochemical detection of lymph-node metastases in management of breast cancer. International Breast Cancer Study Group. *Lancet.* 1999;354(9182):896-900.
8. Van Diest PJ, Torrenza H, Borgstein PJ, Pijpers R, Bleichrodt RP, Rahusen FD, et al. Reliability of intraoperative frozen section and imprint cytological investigation of sentinel lymph nodes in breast cancer. *Histopathology.* 1999;35(1):14-18.
9. Torrenza H, Rahusen FD, Meijer S, Borgstein PJ, van Diest PJ. Sentinel node investigation in breast cancer: Detailed analysis of the yield from step sectioning and immunohistochemistry. *J Clin Pathol.* 2001;54(7):550-552.
10. Lyman GH, Giuliano AE, Somerfield MR, Benson AB 3rd, Bodurka DC, Burstein HJ, et al. American Society of Clinical Oncology guideline recommendations for sentinel lymph node biopsy in early-stage breast cancer. *J Clin Oncol.* 2005;23(5):7703-7720.
11. 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(16):4807-4816.
12. Hernández G, Contreras A, Betancourt L, Acosta V, Pérez R, Gómez A, et al. Reunión de Consenso ganglio centinela en carcinoma de mama. *Rev Venez Oncol.* 2010;22(2):133-141.
13. Tanis PJ, Boom RP, Koops HS, Faneyte IF, Peterse JL, Nieweg OE, et al. Frozen section investigation of the sentinel node in malignant melanoma and breast cancer. *Ann Surg Oncol.* 2001;8(3):222-226.
14. Hughes SJ, Xi L, Raja S, Gooding W, Cole DJ, Gillanders WE, et al. A rapid, fully automated, molecular-based assay accurately analyzes sentinel lymph nodes for the presence of metastatic breast cancer. *Ann Surg.* 2006;243(3):389-398.
15. Leidenius MH, Krogerus LA, Toivonen TS, Von Smitten KJ. The feasibility of intraoperative diagnosis of sentinel lymph node metastases in breast cancer. *J Surg Oncol.* 2003;84(2):68-73.
16. Fortunato L, Amini M, Farina M, Rapacchietta S, Costarelli L, Piro FR, et al. Intraoperative examination of sentinel nodes in breast cancer: Is the lass half full or half empty? *Ann Surg Oncol.* 2004;1(11):1005-1010.
17. Visser M, Jiwa M, Horstman A, Brink A, Pol RP, van Diest P, et al. Intra-operative rapid diagnosis method based on CK19 mRNA expression for the detection of lymph node metastases in breast cancer. *Int J Cancer.* 2008;122(11):2562-2567.
18. Tamaki Y, Akiyama F, Iwase T, Kaneko T, Tsuda H, Sato K, et al. Molecular detection of lymph node metastases in breast cancer patients: Results of a multicentre trial using the one step nucleic acid amplification assay. *Clin Cancer Res.* 2009;15(8):2879-2884.
19. Cserni G, Bianchi S, Boecker W, Decker T, Lacerda M, Rank F, et al. Improving the reproducibility of diagnosing micrometastases and isolated tumour cells. *Cancer.* 2005;103(2):358-367.
20. Viale G, Bosari S, Mazzarol G, Galimberti V, Luini A, Veronesi P, et al. Intraoperative examination of axillary sentinel lymph nodes in breast carcinoma patients. *Cancer.* 1999;85(11):2433-2438.
21. Ku NN. Pathologic examination of sentinel lymph nodes in breast cancer. *Surg Oncol Clin North Am.* 1999;8(3):469-479.
22. Salem AA, Douglas-Jones AG, Sweetland HM, Mansel RE. Intraoperative evaluation of axillary sentinel lymph nodes using touch imprint cytology and immunohistochemistry. Part II, results. *Eur J*

- Surg Oncol. 2006;32(5):484-487.
23. Nährig JM, Richter T, Kuhn W, Avril N, Flatau B, Kowolik J, et al. Intraoperative examination of sentinel lymph nodes by ultra-rapid immunohistochemistry. *Breast J.* 2003;9(4):277-281.
  24. Leikola JP, Toivonen TS, Krogerus LA, von Smitten KA, Leidenius MH. Rapid immunohistochemistry enhances the intraoperative diagnosis of sentinel lymph node metastases in invasive lobular breast carcinoma. *Cancer.* 2005;104(1):14-19.
  25. Choi YJ, Yun HR, Yoo KE, Kim JH, Nam SJ, Choi YL, et al. Intraoperative examination of sentinel lymph nodes by ultra-rapid immunohistochemistry in breast cancer. *Jpn J Clin Oncol.* 2006;36(8):489-493.
  26. Blumencranz P, Whitworth PW, Deck K, Rosenberg A, Reintgen D, Beitsch P, et al. Scientific impact recognition award. Sentinel node staging for breast cancer: Intraoperative molecular pathology overcomes conventional histologic sampling errors. *Am J Surg.* 2007;194(4):426-432.
  27. Guillen MP, Carrasco L, Chaves A, Campillo A, Carrillo A, Aguayo JL. One-Step nucleic acid amplification (OSNA) assay for sentinel lymph node metastases as an alternative to conventional postoperative histology in breast cancer: A cost-benefit analysis. *Cir Esp.* 2011;89(7):456-462.
  28. 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 multicentre study in Japan. *Cancer.* 2012;118(14):3477-3483.