

Técnica OSNA para ganglio centinela en cáncer de mama

HELENA DE LA CUEVA SAPIÑA¹, IVÁN RIENDA MARTÍNEZ²

Servicios de ¹Oncología Médica y ²Anatomía Patológica. Hospital Universitari i Politècnic La Fe. Valencia

RESUMEN

La biopsia selectiva de ganglio centinela es el método estándar de estadificación axilar en pacientes con cáncer de mama inicial por su menor morbilidad respecto a la linfadenectomía. El ganglio o ganglios obtenidos pueden examinarse mediante los métodos convencionales basados en la tinción con hematoxilina-eosina y la inmunohistoquímica. Sin embargo, en los últimos años ha emergido con fuerza la técnica molecular denominada OSNA, que aporta múltiples ventajas respecto a los métodos histopatológicos clásicos, de forma que su uso se ha extendido desde el entorno intraoperatorio, donde se desarrolló inicialmente, hasta el estudio ganglionar en diferido. Además, es válido tanto en cirugía primaria como tras un tratamiento neoadyuvante.

En este trabajo trataremos de resumir en qué consiste la técnica OSNA y sus potenciales ventajas a nivel clínico y para el sistema sanitario, así como sus principales limitaciones.

PALABRAS CLAVE: Cáncer de mama. Técnica OSNA. Ganglio centinela. Ventajas. Análisis intraoperatorio.

INTRODUCCIÓN

La biopsia selectiva del ganglio centinela (BSGC) como procedimiento de estadificación ganglionar aplicado al cáncer de mama en estadios iniciales es una técnica que desde su implantación progresiva a partir de los años noventa del siglo pasado ha supuesto una importante reducción en la morbilidad de las pacientes con respecto a la linfadenectomía axilar (LA), que fue durante décadas el procedimiento estándar para el estudio y el tratamiento de los ganglios axilares independientemente de la sospecha clínica de su afectación (1).

ABSTRACT

Selective sentinel lymph node biopsy is the usual method of staging breast cancer in early stages due to its lower morbidity compared to axillary lymphadenectomy. The node or nodes obtained can be examined by different methods, classically hematoxylin-eosin staining and immunohistochemistry have been used. In recent years, the OSNA technique has emerged strongly, a molecular method that provides many advantages over conventional methods, and its use has spread from the intraoperative setting, where it was initially started, to deferred lymph node study and is valid in primary surgery and after neoadjuvant treatment.

In this work we will try to summarize what the OSNA technique consists of, its possible advantages at a clinical level and for the health system, as well as its main limitations.

KEYWORDS: Breast cancer. OSNA technique. Sentinel lymph node. Advantages. Intraoperative assessment.

Con la BSGC se obtiene un número limitado de ganglios que pueden analizarse con diferentes técnicas, desde la clásica tinción con hematoxilina-eosina (HE) e inmunohistoquímica hasta las técnicas moleculares como la denominada *one-step nucleic acid amplification* (OSNA), que es actualmente la técnica recomendada, especialmente cuando se requiere conocer el resultado del análisis del ganglio de forma intraoperatoria, aunque su empleo se aconseja también para el análisis ganglionar en diferido (2).

Se describirá a continuación la técnica de procesamiento de un ganglio mediante OSNA, sus potenciales aplicaciones y ventajas a nivel clínico y para el sistema sanitario, así como sus principales limitaciones.

TÉCNICA OSNA

FUNDAMENTOS

La técnica OSNA es un método de patología molecular que consiste en la solubilización completa de un ganglio linfático seguida de una amplificación isotérmica mediada por bucle acoplada a transcripción inversa o *reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification* (RT-LAMP) de un ARN mensajero (ARNm) diana, en concreto, del ARNm que codifica la proteína citoqueratina-19 (CK19) (3).

La RT-LAMP es una técnica de amplificación de ARN altamente específica, eficiente y rápida que, a diferencia del método de reacción en cadena de la polimerasa o *polymerase chain reaction* (PCR), se produce en condiciones isotérmicas (unos 65 °C) (4,5).

Una importante ventaja de la RT-LAMP sobre los métodos basados en PCR es que se evita la amplificación de ADN genómico de doble cadena, lo que limita la aparición de resultados falsos positivos (3,5).

La amplificación de ácidos nucleicos en la RT-LAMP genera una gran cantidad de ion pirofosfato (PPi) como subproducto y, a su vez, el PPi reacciona con el ion magnesio presente en la solución de tamponado, lo que da lugar a un precipitado de PPi de magnesio que otorga turbidez a la disolución (6). La técnica OSNA permite monitorizar la amplificación del ARNm de CK19 mediante la medición de la turbidez de la disolución durante la propia reacción de amplificación (3).

Las citoqueratinas (CK) son proteínas que constituyen los filamentos intermedios del citoesqueleto de las células epiteliales normales y de las células de carcinoma; en concreto, la expresión de CK19 mediante inmunohistoquímica (IHQ) es positiva en un 98,4 % de los carcinomas de mama (7). Se recomienda comprobar mediante IHQ que al menos un 30 % de la celularidad del tumor primario expresa CK19 antes de realizar el método OSNA para evitar posibles falsos negativos (aunque puede encontrarse ARNm de la CK19 también en casos en los que no existe expresión proteica de CK19) (8).

PROCESAMIENTO DEL GANGLIO

Una vez tomada la BSGC, la muestra debe introducirse rápidamente en un contenedor estéril estanco bien cerrado para evitar su contaminación, su deshidratación y la degradación del ARN. La muestra irá en fresco, sin ningún líquido fijador, conservante u otros. La forma ideal para almacenar y transportar la muestra desde el quirófano hasta el laboratorio de patología será en hielo (entre 0 y 4 °C) y en un tiempo inferior a 15 minutos.

Siguiendo el protocolo del último consenso de la Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria (SESPM) sobre la BSGC (2), la muestra deberá estar

convenientemente identificada con los datos de la paciente y acompañada de una solicitud de estudio de BSGC mediante método OSNA, que deberá incluir los datos de filiación de la paciente, diagnóstico histológico del tumor, topografía de la biopsia (axilar, intramamaria y mamaria interna) y lateralidad, número de ganglios centinelas extraídos y si la paciente ha recibido terapia preoperatoria sistémica. En caso de que alguno de los ganglios centinelas remitidos cuente con marcador metálico o semilla, este dato deberá especificarse también en la solicitud y el ganglio en cuestión deberá remitirse de forma individualizada.

Una vez en el laboratorio de patología, el ganglio o los ganglios centinelas serán aislados del tejido adiposo extraganglionar. El tejido adiposo se fijará en formalina y se incluirá en parafina para un análisis histológico convencional en diferido que permita objetivar la eventual extensión extracapsular de la metástasis.

Si existe indicación de estudio intraoperatorio de la BSGC, cada ganglio centinela se procesará de forma inmediata. En caso de estudio diferido, las muestras podrán permanecer refrigeradas (de 2 a 8 °C) durante un máximo de 8 horas. Para tiempos mayores, las muestras deberán conservarse a -80 °C.

Cada ganglio centinela será completamente solubilizado y homogeneizado en una disolución de lisado tamponada (habiendo retirado el marcador metálico o semilla en aquellos casos en que los que el ganglio cuente con ellos). Posteriormente, esta muestra se añade a una segunda disolución previamente preparada que contendrá todos los elementos necesarios para que se lleven a cabo las reacciones de transcripción inversa y de amplificación del gen diana, si este estuviera presente en la muestra. Este procedimiento se realizará a una temperatura ambiente inferior a 20 °C y durante un tiempo de alrededor de 2 minutos (9).

El resultado del procedimiento previo, denominado “disolución de reacción”, será incubado a 64 °C para provocar la reacción de RT-LAMP. Cuanto mayor sea la concentración del gen diana en la muestra, su amplificación se realizará más velozmente y la turbidez de la disolución de reacción aumentará de forma más rápida. La turbidez de la disolución se medirá de forma simultánea a la reacción de amplificación génica a través de la emisión de un haz de luz de una longitud de onda central de 465 nm dirigido hacia la disolución de reacción y detectando la luz transmitida a través de esta. Una vez que la turbidez alcanza un umbral determinado, se obtiene el tiempo que este fenómeno ha tardado en producirse, lo que se conoce como “tiempo de subida” (3,9).

Previamente a todo este proceso (o de forma simultánea fuera de un contexto intraoperatorio), se habrá elaborado una curva estándar de relación entre la concentración en número de copias de ARNm de CK19/ μ L logarítmica y los tiempos de subida a partir de tres muestras de calibración con concentración de ARNm

de CK19 conocida. A partir de esta curva estándar, puede calcularse el número de copias de ARNm de CK19/ μ L de nuestra muestra conociendo el tiempo de subida que hemos medido en la disolución de reacción del ganglio centinela (9).

Toda la manipulación de la muestra y el aparataje necesario deben realizarse por personal cualificado y entrenado para ello y manteniendo las medidas necesarias para evitar la contaminación de la muestra y las medidas de seguridad específicas dirigidas frente a riesgos laborales en el laboratorio.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

A partir del número de copias de ARNm de CK19/ μ L determinado mediante el método OSNA, podrán ofrecerse los siguientes resultados clínicos (3):

- *Macrometástasis*: más de 5000 copias de ARNm de CK19/ μ L equivalen a un foco metastásico mayor de 2 mm de diámetro en un estudio histológico convencional.
- *Micrometástasis*: entre 250 y 5000 copias de ARNm de CK19/ μ L equivalen a un foco metastásico de entre 0,2 y 2 mm de diámetro.
- *Células tumorales aisladas o isolated tumour cells (ITC)*: entre 160 y 250 copias de ARNm de CK19/ μ L equivalen a grupos tumorales inferiores a 200 células o 0,2 mm de diámetro.

APLICACIONES DE LA TÉCNICA OSNA

ANÁLISIS INTRAOPERATORIO DE LA BSGC CON OSNA

La BSGC tiene como objetivo detectar la presencia de metástasis en el ganglio linfático y cuantificarlas por su tamaño, información relevante a la hora de establecer el pronóstico y el tratamiento complementario. En muchas ocasiones de este resultado también depende la decisión de proceder o no al vaciamiento axilar. En estos casos surge la conveniencia de procesar el ganglio o los ganglios obtenidos con una técnica con suficiente sensibilidad y en un tiempo que permita tomar la decisión de forma inmediata durante el acto quirúrgico del tumor primario, lo que evita una segunda intervención de considerarse adecuada la linfadenectomía.

Existen diferentes métodos de análisis intraoperatorio del ganglio centinela: los métodos convencionales y los moleculares, como el OSNA. Por métodos convencionales nos referimos a aquellos basados en la tinción de HE, como la observación de impronta citológica o el corte por congelación. La sensibilidad es variable según los estudios, pero ronda el 63 % para la impronta (81 % para macrometástasis y 22 % para micrometástasis) y el 78 % para el corte por congelación (94 % para macrome-

tástasis, 40 % para micrometástasis). La especificidad para ambos es del 100 % (10,11). El examen de corte por congelación requiere más tiempo, así como cierta habilidad del patólogo, y está sujeto a la variabilidad interobservador (12). En la citología el resultado es más rápido, aunque se examina un número limitado de células. En ambos casos solo es posible examinar una parte del ganglio durante la intervención. El resto se estudia en diferido con tinción histológica y citoqueratinas. En ambas técnicas siempre existe un posible sesgo por el muestreo que se realiza del ganglio (13,14).

Por su parte, la técnica OSNA fue desarrollada inicialmente para mejorar los resultados del análisis intraoperatorio del ganglio centinela. A diferencia de la citología y del corte por congelación, con OSNA se cuantifica el ARNm de la CK19 del ganglio completo en un solo acto. Permite detectar y diferenciar la presencia de micro- y macrometástasis en los ganglios con una concordancia del 98,2 % con los métodos histopatológicos clásicos empleando HE y citoqueratinas, prácticamente en ausencia de falsos positivos, según los primeros resultados publicados por Tsujimoto en 2007 (3). Actualmente es un método estandarizado y un metaanálisis del conjunto de los estudios muestra que, cuando se estudian por OSNA, se detecta una proporción ligeramente mayor de ganglios positivos, a expensas de un aumento en la detección de micrometástasis, con una sensibilidad del 87 % y una especificidad del 98 % para la detección de macrometástasis (15), superior a los métodos clásicos.

Con respecto al tiempo que se requiere para llevar a cabo el procedimiento, según los estudios varía desde menos de 30 minutos a 39,6 minutos para analizar un ganglio con OSNA, lo que aumenta en 5-10 minutos el tiempo por cada ganglio adicional incluido (14). Por tanto, es factible su realización durante el acto quirúrgico, cuyo tiempo medio de duración se acorta si se utiliza el método molecular en comparación con el examen de corte por congelación (de $70 \pm 10,5$ a $42,1 \pm 5,1$ minutos) (16).

Por todo ello, se confirma que, empleando la técnica OSNA, es posible realizar la LA (en caso de estar indicada) en el mismo acto quirúrgico del tumor primario en la gran mayoría de los casos, lo que reduce el número de linfadenectomías axilares en un segundo tiempo frente a los métodos convencionales de análisis de la BSGC (17,18), así como el potencial impacto para el sistema sanitario y para la paciente que deriva de realizar la LA en una segunda intervención y la demora en el inicio del tratamiento adyuvante (19).

A nivel de coste-efectividad, se considera que el empleo de OSNA como técnica intraoperatoria mejora los resultados a corto plazo en cuanto a la pérdida de calidad de vida en las pacientes en relación con la ansiedad del retraso diagnóstico y una segunda operación consecuencia del estudio diferido del ganglio centinela (14).

Aunque el coste directo de la técnica OSNA es mayor, ahorra tiempo de recursos humanos frente al análisis histológico convencional, especialmente cuando se analizan más de dos ganglios (2), y, según diferentes análisis económicos, supone también un ahorro para el sistema sanitario, asociado fundamentalmente a la reducción de los gastos que comportan un segundo ingreso e intervención quirúrgica (20-22). Otros autores ponen en duda el ahorro de costes para el sistema sanitario y para las pacientes a largo plazo y asumen que el aumento de sensibilidad de la técnica OSNA implicaría un coste adicional por cada caso detectado y la morbilidad asociada al aumento en el número de linfadenectomías (14), aunque este aspecto es cuestionable, como se verá más adelante.

CARGA TUMORAL TOTAL

Con la técnica OSNA no solo es posible detectar la presencia de metástasis en el ganglio centinela, también permite cuantificar y sumar la carga de ARNm de CK19 de todos los ganglios centinelas extraídos, lo que se conoce como “carga tumoral total” (CTT), valor que se relaciona con la afectación de más ganglios linfáticos axilares (23,24), incluso con una mejor capacidad predictiva de presencia de metástasis en el ganglio no centinela que el número de ganglios centinelas afectados (25). Se han desarrollado nomogramas para predecir la afectación de ganglio no centinela mediante la CTT (26). Además, la CTT es un factor pronóstico independiente, de manera que una carga elevada (con un punto de corte de 25 000 copias de ARNm de CK19 por mL) se correlaciona de forma significativa con una menor supervivencia libre de enfermedad a distancia, supervivencia libre de recidiva locoregional y supervivencia global a 5 años (27). En el último consenso de la SESPM se considera la CTT, antes que el número de ganglios afectados, como el criterio a aplicar para decidir la indicación de LA en casos de axila clínicamente negativa con cirugía primaria si se ha utilizado OSNA (2).

OTRAS SITUACIONES: ANÁLISIS EN DIFERIDO DE LA BSGC. TRATAMIENTO SISTÉMICO PRIMARIO

En el consenso de 2022, la SESPM también considera que OSNA es el método de elección cuando se haya optado por el examen del ganglio centinela en diferido, pues, entre otras ventajas, permite analizar el ganglio completo, a diferencia de la tinción de HE (no es posible estudiar la totalidad del ganglio por limitaciones de la propia técnica), y reserva esta alternativa para casos de CK19 negativa por inmunohistoquímica en el tumor primario (2). Establece como criterios para realizar el estudio en diferido aquellos casos en los que se considere que el riesgo de infiltración ganglionar es bajo y, por tanto, con pocas probabilidades de que se acabe realizando una LA.

Por otro lado, OSNA es un método válido tanto en pacientes con cirugía primaria como en aquellas que han recibido un tratamiento sistémico primario (TSP), en el que se considera que, a pesar de los cambios histológicos que pueda haber inducido la quimioterapia, puede detectarse la presencia de metástasis ganglionares con la misma precisión que con los métodos histopatológicos convencionales, y que al igual que en la cirugía primaria, reduce la necesidad de una segunda intervención (28,29).

Se ha publicado que la CTT posneoadyuvancia también tiene valor pronóstico, de forma que una carga elevada se asocia con una peor supervivencia libre de enfermedad y que un nomograma que incluye la CTT y variables clínico-patológicas predice la afectación de los ganglios no centinelas (30), aunque se necesitan estudios prospectivos para confirmar estos hallazgos.

OSNA Y RELACIÓN CON LA SUPERVIVENCIA

Sobre si el empleo de OSNA puede afectar a la supervivencia global y a otras variables clínicas en comparación con otros métodos de estadificación ganglionar, hay pocos estudios en la bibliografía que tengan este tipo de objetivos. Recientemente se ha publicado un estudio retrospectivo que compara OSNA como análisis intraoperatorio frente al examen de corte por congelación y el estudio histológico diferido sin encontrar ninguna diferencia estadísticamente significativa en supervivencia global, supervivencia libre de enfermedad o riesgo de recaída local entre los tres grupos (16). En otro trabajo encuentran que las pacientes con cáncer de mama RE+ Her2- que recibieron tratamiento endocrino adyuvante exclusivo, estadificadas como pN0 con el método molecular, tienen una supervivencia libre de recaída a distancia superior a las que resultaron pN0 por histología, lo que sugiere que la explicación sea una posible infraestadificación en los ganglios analizados por el método convencional (31).

CONTROVERSIAS Y LIMITACIONES

Probablemente el aspecto más controvertido de la incorporación de OSNA a la práctica clínica sea la preocupación por un aumento en la detección de metástasis que histológicamente no se hubieran observado y que esto conllevara un aumento de linfadenectomías no indicadas por el método considerado de referencia. Sin embargo, el aumento de sensibilidad se produce fundamentalmente a costa de una mayor prevalencia de micrometástasis en el estudio por OSNA frente al corte por congelación y al estudio histológico definitivo (11,16,18,31), y en estos casos habitualmente (salvo en el contexto neoadyuvante) la linfadenectomía no se considera indicada (32).

En su metaanálisis, Tiernan y cols. postulan que, aunque la sensibilidad y la especificidad de OSNA son adecuadas, su valor predictivo positivo para la detección de macrometástasis es del 79 %, lo que supondría que un 21 % de pacientes con macrometástasis por OSNA serían sometidas a una LA cuando por histología se hubiese considerado como ganglios sin macrometástasis (11). Pero en la práctica, con la adopción cada vez más extendida del protocolo de manejo de la axila basado en los resultados de los ensayos clínicos ACOSOG Z0011 y AMAROS (33,34), el empleo de OSNA no tendría como consecuencia un aumento de linfadenectomías axilares, radioterapia axilar o tratamiento sistémico adyuvante (35).

Entre las limitaciones para la aplicación de OSNA, en primer lugar, se recomienda que para evitar falsos negativos se lleve a cabo únicamente en aquellas pacientes cuyo tumor primario expresa CK19 al menos en el 30 % de las células. Los casos negativos en las diferentes series son de hasta un 4-7 % y puede ser más frecuente la ausencia de expresión en tumores de fenotipo triple negativo o *basal-like* (7,36).

En segundo lugar, OSNA, en pacientes con TSP, tiene la desventaja de que, a diferencia del examen histológico convencional, no permite comprobar los posibles signos de regresión del tumor en relación con el tratamiento. Podemos saber, por ejemplo, si un ganglio que era positivo en la biopsia inicial tras TSP no lo es, pero no si ha habido algún grado de respuesta a este, lo que en algunos casos impide realizar adecuadamente el *residual cancer burden* (RCB), con la consiguiente pérdida de información pronóstica (37). Por este motivo, en el supuesto de TSP, el último consenso de la SESPMP recomienda considerar caso a caso en los comités de mama las ventajas de OSNA frente a la imposibilidad de calcular el RCB de forma exacta cuando se considere un dato relevante, habitualmente tumores cN0 o cN1 negativizados (2).

CONCLUSIONES

La técnica OSNA se ha convertido en el método de elección del estudio del ganglio centinela. Entre las principales ventajas que se han atribuido a este método frente al estudio histológico convencional del ganglio podemos destacar la automatización y la estandarización del proceso, su elevada sensibilidad, la posibilidad de análisis completo del ganglio intraoperatorio y, con ello, un menor número de segundas intervenciones, el ahorro asociado de recursos humanos y económicos y la posibilidad de determinar la CTT.

Se considera indicada tanto para el análisis intraoperatorio como en diferido, así como en casos de cirugía primaria o tras tratamiento neoadyuvante, con la excepción de aquellos casos en los que sea importante conocer con precisión el RCB o los tumores que no expresen CK19.

Conflicto de intereses: los autores declaran no tener conflicto de interés.

CORRESPONDENCIA:

Helena de la Cueva Sapiña
Servicio de Oncología Médica
Hospital Universitari i Politècnic La Fe
Avinguda de Fernando Abril Martorell, 106
46026 Valencia
e-mail: delacueva_hel@gva.es

BIBLIOGRAFÍA

- Langer I, Guller U, Berclaz G, et al. Morbidity of sentinel lymph node biopsy (SLN) alone versus SLN and completion axillary lymph node dissection after breast cancer surgery: a prospective Swiss multicenter study on 659 patients. *Ann Surg* 2007;245(3):452-61.
- Bernet L, Piñero A, Martínez M et al. Consenso de la Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria (SESPM) sobre la biopsia selectiva del ganglio centinela (BSGC) y el manejo axilar en el cáncer de mama (2022). *Revista de Senología y Patología Mamaria* 2022;35(4):243-59.
- Tsujimoto M, Nakabayashi K, Yoshidome K, et al. One-step Nucleic Acid Amplification for Intraoperative Detection of Lymph Node Metastasis in Breast Cancer Patients. *Clin Cancer Res* 2007;13 (16):4807-16.
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 2000;28(12):E63.
- Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes* 2002;16(3):223-9.
- Mori Y, Nagamine K, Tomita N, et al. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;289(1):150-4.
- Chu PG, Weiss LM. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology* 2002;40(5):403-39.
- Pegolo E, Puppini C, Gerometta A, et al. One-step nucleic acid amplification (OSNA) for intraoperative evaluation of sentinel lymph node status in breast cancer: a comparative study between CK19 protein expression and CK19 mRNA level in primary tumors and lymph node metastasis. *Virchows Arch* 2013;463(1):7-15.
- Systemex. Gene Amplification Detector RD-210 Instrucciones de uso [Internet]. Japón: Systemex Corporation; 2021 May [consultado: 2022 Oct]. Disponible en: <https://www.mysystemex.com/es/documentacion>
- Tew K, Irwig L, Matthews A, et al. Meta-analysis of sentinel node imprint cytology in breast cancer. *Br J Surg* 2005;92:1068-80.
- Liu L.C, Lang J.E, Lu Y, et al. Intraoperative frozen section analysis of sentinel lymph nodes in breast cancer patients: a meta-analysis and single-institution experience. *Cancer* 2011;117:250-8.
- Layfield DM, Agrawal A, Riche H, et al. Intraoperative assessment of sentinel lymph nodes in breast cancer. *Br J Surg* 2011;98:4-17.
- van der Noordaa MEM, Vrancken MTFD, Rutgers EJT, et al. The intraoperative assessment of sentinel nodes-Standards and controversies. *The Breast* 2017;34:64-9.
- Huxley N, Jones-Hughes T, Coelho H, et al. A systematic review and economic evaluation of intraoperative tests (RD-100i OSNA system and Metasin test) for detecting sentinel lymph node metastases in breast cancer. *Health Technol Assess* 2015;19(2):v-xxv.
- Tiernan JP, Verghese ET, Nair A, et al. Systematic review and meta-analysis of cytokeratin 19-based one step nucleic acid

- amplification versus histopathology for sentinel node assessment in breast cancer. *Br J Surg* 2014;101:298-306.
16. Bertozzi S, Londero AP, Bulfoni M, et al. One-step nucleic acid amplification system in comparison to the intraoperative frozen section and definitive histological examination among breast cancer patients: a retrospective survival study. *Front Oncol* 2022;12:847858.
 17. Cutress RI, McDowell A, Gabriel FG, et al. Observational and cost analysis of the implementation of breast cancer sentinel node intraoperative molecular diagnosis. *J Clin Pathol* 2010;65(6):522-9.
 18. Santaballa A, de la Cueva H, Salvador C, 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.
 19. Klingler S, Marchal F, Rauch P, et al. Intraoperative detection of lymph node metastasis using one-step nucleic acid amplification (OSNA) in breast cancer patients: effect on second surgery rate and delay for adjuvant therapy. *J Clin Oncol* 2012;30:(Suppl. 15):10517.
 20. Burke M, Patton T. NHS Technology Adoption Centre: The Cost Impact of Implementing Intraoperative Testing for the Diagnosis of Patients with Metastatic Breast Cancer in England; 2010. Available from: http://www.ntac.nhs.uk/web/FILES/Breast-LymphNode/nhs_1290615229_Economic_report.pdf
 21. Guillén-Paredes MP, Carrasco-González L, Chávez-Benito A, et al. One-step nucleic acid amplification (OSNA) assay for sentinel lymph node metastases as an alternative to conventional post-operative histology in breast cancer: a cost-benefit analysis. *Cir Española* 2011;89:456-52.
 22. Saruta Y, Puig-Juntoy J. Cost and Budget impact analysis of an accurate intraoperative sentinel lymph node diagnosis for breast cancer metastasis. *Appl Health Econ Policy* 2016;14:323-35.
 23. Espinosa-Bravo M, Sansano I, Pérez-Hoyos S, et al. Prediction of non-sentinel lymph node metastasis in early breast cancer by assessing total tumoral load in the sentinel lymph node by molecular assay. *Eur J Surg Oncol* 2013;39(7):766-73.
 24. Fougo JL, Amendoeira I, Brito MJ, et al. Sentinel node total tumour load as a predictive factor for non-sentinel node status in early breast cancer patients - The portle study. *Surg Oncol* 2020;32:108-114.
 25. Peg V, Espinosa-Bravo M, Vieites B, 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.
 26. Rubio, IT, Espinosa-Bravo M, Rodrigo M, et al. Nomogram including the total tumoral load in the sentinel nodes assessed by one-step nucleic acid amplification as a new factor for predicting non-sentinel lymph node metastasis in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2014;147(2):371-80.
 27. Peg V, Sansano I, Vieites B, et al. Role of total tumor load of sentinel lymph node on survival in early breast cancer patients. *The Breast* 2017;33:8-13.
 28. Osako T, Tsuda H, Horii R, et al. Molecular detection of lymph node metastases in breast cancer patients treated with systemic chemotherapy: a prospective multicenter trial using the one-step nucleic acid amplification assay. *Br J Cancer* 2013;109(6):1693-8.
 29. Espinosa-Bravo M, Navarro-Cecilia J, Ramos M, et al. Intraoperative assessment of sentinel lymph node by one-step nucleic acid amplification in breast cancer patients after neoadjuvant treatment reduces the need for a second surgery for axillary lymph node dissection. *Breast* 2017;31:40-5.
 30. Vieites B, López-García MA, Martín-Salvago MD, et al. Predictive and prognostic value of total tumor load in sentinel lymph nodes in breast cancer patients after neoadjuvant treatment using one-step nucleic acid amplification. *Clin Transl Oncol* 2021;23(7):1377-87.
 31. Shimazu K, Miyake T, Okuno J, et al. One-step acid amplification can identify sentinel node-negative breast cancer patients with excellent prognosis. *Anticancer Res* 2019;39(3):1447-54.
 32. Galimberti V, Cole BF, Zurrida S, et al. International Breast Cancer Study Group Trial 23-01 investigators. Axillary dissection versus no axillary dissection in patients with sentinel-node micrometastases (IBCSG 23-01): a phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2013;14:297-305.
 33. Brackstone M, Baldassarre FG, Perera FE, et al. Management of the Axilla in Early-Stage Breast Cancer: Ontario Health (Cancer Care Ontario) and ASCO Guideline. *J Clin Oncol* 2021;39(27):3056-82.
 34. Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S, et al.; on behalf of the ESMO Guidelines Committee. Early Breast Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2019;30(8):1194-220.
 35. Hintzen KFH, Rooij L, Schouten N, et al. Molecular analysis of sentinel lymph nodes in patients with breast cancer using one-step nucleic acid amplification (OSNA): Does not lead to overtreatment in the current era of de-escalating axillary management. *Surg Oncol* 2020;35:224-8.
 36. Vilardell F, Novell A, Martin J, et al. Importance of assessing CK19 immunostaining in core biopsies in patients subjected to sentinel node study by OSNA. *Virchows Arch* 2012;460(8):569-75.
 37. Symmans WF, Peintinger F, Hatzis C, et al. Measurement of residual breast cancer burden to predict survival after neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol* 2007;25(28):4414-22.