

Ganglio centinela en cáncer de mama: ¿histológico o molecular? Estudio diagnóstico comparativo multicéntrico español. Grupo de Estudios Senológicos

L. Bernet¹, R. Cano², M. Martínez-Benaclocha¹, B. Dueñas³, X. Matias-Guiu⁴, Ll. Morell²,
J. Palacios⁵, C. Ramírez⁶, R. Rezola⁷, M. J. Robles⁵, I. Ruiz⁸, A. Velasco⁴, B. Vieites⁵, F. Sevilla¹,
J. Torró¹, J. Medrano¹, B. Ballester⁹, J. M. de la Cámara de las Heras¹⁰

¹Servicio de Patología. Hospital Lluís Alcanyís. Xàtiva, Valencia. ²Servicio de Patología. Hospital de la Ribera. Alzira, Valencia. ³Servicio de Cirugía. Hospital Ciudad de Jaén. Jaén. ⁴Servicio de Patología. Hospital Arnau de Vilanova. Lleida. ⁵Servicio de Patología. Hospital Virgen del Rocío. Sevilla. ⁶Servicio de Patología. Hospital Ciudad de Jaén. Jaén. ⁷Servicio de Patología. Instituto Oncológico. Donostia. ⁸Servicio de Patología. Hospital de Donostia. Donostia. ⁹Servicio de Cirugía. Hospital de la Ribera. Alzira, Valencia. ¹⁰Servicio de Biblioteca. Hospital de la Ribera. Alzira, Valencia

RESUMEN

Introducción: La biopsia del ganglio centinela (GC) está aceptada como el procedimiento estándar para la cirugía conservadora de la axila en el cáncer de mama, pero la gran variabilidad existente en los protocolos de estudio anatomopatológicos han impedido una correcta estandarización diagnóstica.

Objetivo: Comparar los resultados de un nuevo método molecular ("One-step-Nucleic-Acid-Amplification", OSNA) con los resultados de los procedimientos habituales y evaluar si es posible la implementación del OSNA como procedimiento de elección para el diagnóstico intraoperatorio.

Material y métodos: Se estudió una serie de 181 GC procedentes de seis hospitales. De cada ganglio, se realizaron secciones de 2 mm de espesor hasta agotar el ganglio. Se incluyeron todas las secciones de manera alternativa "a" y "c" para estudio histológico, y "b" y "d" para OSNA.

Resultados: Se obtuvo un nivel de concordancia entre el procedimiento histológico y el molecular del 99,45%.

Conclusiones: El estudio multicéntrico demuestra que el OSNA es un procedimiento altamente sensible, específico y reproducible y que permite la estandarización del diagnóstico intraoperatorio del GC en cáncer de mama.

Palabras clave: Ganglio centinela. Cáncer de mama. Diagnóstico intraoperatorio. mRNA-CK19. OSNA.

Recibido: 31-01-2010.

Aceptado: 27-02-2010.

Correspondencia: Laia Bernet Vegué. Servicio de Patología. Hospital Lluís Alcanyís. Ctra. de Xàtiva a Silla, km. 2. 46800 Xàtiva, Valencia. e-mail: bernet_lai@gva.es

ABSTRACT

Background: The biopsy of the sentinel node (SN) has been established as the standard procedure for conservative axillary surgery but its adequate diagnostic standardization has not yet been achieved since the protocols for histopathologic study have been highly variable.

Objective: Our goal is to compare the results of this new method with the results of conventional histological tests, to evaluate the feasibility of this procedure for the intra-operative study of SN in breast cancer surgery and to evaluate it as a way to standardize the sentinel node procedure.

Material and methods: The study included 181 cases. Parallel, 2 mm-thick sections were performed to drain the lymph node which were then processed alternately for histological analysis ("a" and "c") and the others ("b" and "d") following the OSNA procedure.

Results: A concordance level of 99.45% was found between the histological and the molecular procedure.

Conclusions: Our multicentric OSNA assay for sentinel node in breast cancer demonstrates that this is a highly sensitive, specific and reproducible technique that allows the standardization of the diagnostic procedure, a needed and up to now unresolved question.

Key words: Sentinel node. Breast cancer. Intraoperative diagnosis. mRNA-CK19. OSNA.

INTRODUCCIÓN

En los últimos quince años, el estudio histopatológico del ganglio centinela (GC) ha sido progresivamente aceptado como el procedimiento de elección para la cirugía conservadora sobre la axila.

La sensibilidad del estudio histológico varía en función de su exhaustividad y de la inclusión de técnicas inmunohistoquímicas (1). Sin embargo, no se ha conseguido una correcta estandarización del método diagnóstico, siendo variable la cantidad de tejido ganglionar estudiado en función de la exhaustividad del protocolo aplicado. En consecuencia, la falta de reproducibilidad ha impedido la definición de grupos pronósticos comparables y por tanto, la correcta evaluación del significado biológico de las metástasis, especialmente de las micrometástasis y de las células tumorales aisladas (CTA).

Por otra parte, el diagnóstico, tal y como se recomienda en el último documento de consenso para el ganglio centinela de cáncer de mama, debe ser intraoperatorio siempre que sea posible (2), lo cual limita la posibilidad de dar un diagnóstico basado en el estudio de la totalidad del ganglio.

Recientemente, se ha descrito un nuevo método molecular (*One-Step-Acid-Nucleic-Amplification*) basado en la amplificación del ARNm la citoqueratina 19 (ARNm-CK19), altamente sensible, específico (3,4), aplicable al diagnóstico intraoperatorio y que permite el estudio de la totalidad del ganglio. Sus principales limitaciones consisten en que, al basarse en el estudio del tejido homogeneizado no permite la ubicación de la metástasis en el ganglio ni la evaluación morfológica de las lesiones. Otras posibles limitaciones consisten en la posibilidad de falsos positivos por inclusiones epiteliales benignas (5,6) y virtualmente, la expresión ilegítima de ARNm-CK19 y de pseudogenes. En ambos casos, sin embargo, el número de copias de ARNm-CK19 sería inferior al punto de corte de positividad del sistema (7).

Especial consideración merecen los carcinomas de mama inmunohistoquímicamente CK19 negativos que, aunque infrecuentes (1-2% de todos los carcinomas) (8), podrían constituir causa de falso negativo, aunque en la mayoría de casos, la alteración en la expresión proteica suele ser post-transcripcional y no debe alterar la expresión de ARNm-CK19.

Nuestro objetivo fue comparar los resultados de este nuevo método con los resultados del estudio histológico habitual en seis hospitales y evaluar la viabilidad del método OSNA para el diagnóstico intraoperatorio del GC así como sus posibilidades de estandarización.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio incluye 181 ganglios centinela de cáncer de mama recibidos para estudio intraoperatorio en seis hospitales españoles. Se consideró "caso" a cada uno de los GC y no a cada paciente. Se admitieron como centinelas un máximo de 4 ganglios linfáticos por paciente.

Todos los ganglios fueron disecados de la grasa adyacente, pesados y medidos. De cada GC, se realizaron secciones paralelas de 2 mm de espesor que posteriormente fueron procesadas alternativamente para estudio diagnóstico histológico ("a" y "c") y molecular ("b" y "d") según protocolo OSNA (3,4) (Fig. 1).

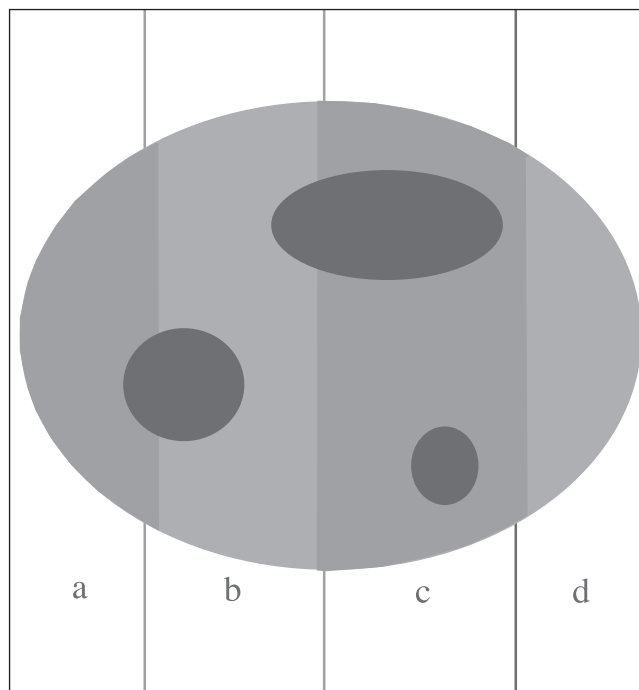


Fig. 1. Seriación macroscópica del ganglio.

El estudio histopatológico consistió en impronta (opcional) y dos cortes seriados de hematoxilina-eosina (HE) intraoperatorios. El resto del tejido se incluyó en parafina realizándose entre uno y seis pares de cortes de 4 μm de espesor cada 150 μm según el protocolo de cada hospital. Un corte de cada par se tiñó con HE y el otro con inmunohistoquímica (IHC) para AE1/AE3 (Dako®).

El protocolo OSNA consistió en homogeneizar el tejido en una solución estabilizante de ARN (Lynorhag, Sysmex®) y posterior amplificación isoterma (65° C) del ARNm-CK19 con el kit de amplificación de Lymoamp (Sysmex®) por medio de una transcriptasa reversa (RT-LAMP) en un equipo de amplificación RD-100i (Sysmex®) (3,4). De cada homogeneizado de tejido, se congeló alícuota de seguridad a -80 °C para posibles futuros estudios. Todos los casos fueron clasificados según el sistema TNM de estadificación (6ª ed.) (9).

En el estudio OSNA se consideró positivo un número de copias de ARNm-CK19 superior a 250 copias/ μL y fueron clasificados como micrometástasis (número de copias $> 250/\mu\text{L} < 5.000/\mu\text{L}$) o macrometástasis (número de copias $> 5.000/\mu\text{L}$), siguiendo el sistema de especificaciones obtenido de estudios anteriores (3,4). Los casos identificados como negativos (< 250 copias ARNm CK19/ μL) por el sistema fueron clasificados como "células tumorales aisladas" (CTA) (n° de copias/ $\mu\text{L} > 100$ y < 250) o verdadero negativo cuando el número de copias de ARNm-CK19/ μL fue < 100 .

Los resultados fueron introducidos en una base de datos electrónica con las siguientes variables: datos de identificación de cada paciente, número de GC obtenidos, peso de cada uno, número de secciones HE y CK, diagnóstico HE y CK, diagnóstico OSNA, tiempo de amplificación y número de copias/ μ L de ARNm-CK19 detectado.

A continuación se realizó estudio de concordancia de los resultados obtenidos por cada uno de los métodos. Se definieron tres niveles de concordancia:

—Nivel I, “Concordancia cualitativa y cuantitativa”: mismo diagnóstico y pN por ambos procedimientos.

—Nivel II, “Concordancia cualitativa pero no cuantitativa”: concordancia respecto a presencia/ausencia de células tumorales, pero distinto pN (TNM).

—Nivel III, “Discordante”: discordancia cualitativa.

Todos los casos discordantes fueron revisados y en caso de persistir la discordancia se realizó Western-Blot y PCR para CK19 de la copia del homogeneizado siguiendo el protocolo descrito previamente (3,4), o se realizaron secciones seriadas para CK hasta agotar el bloque de parafina según la indicación de cada caso.

RESULTADOS

La tabla I describe los resultados diagnósticos antes del estudio de casos discordantes. Se observó concordancia nivel I en 168 casos (92,8%). De estos, 138 fueron negativos para metástasis (76,2%) y 30 positivos (16,5%). De ellos, 25 fueron macrometástasis (13,8%) y 5 micrometástasis (2,7%).

Tres casos (1,6%) mostraron nivel II de concordancia. Dos fueron macrometástasis en OSNA y micrometástasis en el estudio histológico. El primero de ellos corresponde al primer ganglio centinela de cuatro de un mismo paciente, que mostró 13.000 copias/ μ L de ARNm-CK19, mientras que los otros tres fueron negativos por ambos métodos. Aunque se trata de una macrometástasis, se encuentra en el rango inferior en número de copias, lo cual puede corresponder a un diagnóstico histológico de micrometástasis y la discordancia atribuible a sesgo de localización. El segundo caso discordante fue positivo para metástasis en las dos últimas secciones CK del tejido adyacente a la sección incluida para estudio OSNA, lo cual indica asimismo sesgo de localización. El tercer caso

mostró micrometástasis en OSNA y macrometástasis en el estudio histológico diferido. No hubo ningún registro del diagnóstico intraoperatorio en la base de datos, aunque sí de una metástasis de 3,7 mm en las secciones de parafina. El pequeño diámetro de la metástasis puede justificar la discrepancia, atribuible asimismo a sesgo de localización.

Diez casos (5,5%) mostraron nivel III de concordancia (discordante) en los resultados preliminares (Tabla I), 4 de los cuales fueron negativos por método OSNA y positivos histológicamente (2 macrometástasis y 2 micrometástasis). El examen de las macrometástasis histológicas reveló un error de transcripción en la base de datos para uno de los casos, que se incluyó finalmente en el nivel I de concordancia ya que se trataba de una micrometástasis por ambos métodos. En el segundo caso, sólo se observó macrometástasis en la histología intraoperatoria, no apareciendo en secciones sucesivas. Aunque no pudo obtenerse ningún registro de diámetro, es razonable suponer que se trataba de una metástasis de pequeño volumen ya que aparecía sólo en dos cortes consecutivos y no en el resto, permitiendo atribuir la discrepancia a sesgo de localización. Dos de los casos fueron negativos por OSNA y micrometastáticos en el estudio histológico. En el primero, la metástasis era de 0,24 mm, es decir, en el límite inferior de micrometástasis. El otro caso fue negativo OSNA y micrometástasis en histología, aunque el OSNA informó de CTA. En ambos casos la discrepancia fue debida, por tanto, a sesgo de localización.

Otros seis casos “discordantes” en el primer análisis fueron positivos OSNA (4 micrometástasis y 2 macrometástasis)/negativos histología (Tabla I). De las 4 micrometástasis OSNA/negativo histológico, tres mostraban un número de copias entre 250 y 2.600/ μ L, compatible, por su pequeño tamaño, con sesgo de localización. El cuarto caso correspondió a un GC de 1.100 mg que se dividió en tres partes para el estudio OSNA; uno de los tres fragmentos fue macrometástasis tanto por método OSNA como mediante estudio histológico (nivel I concordancia); el segundo fragmento fue micrometástasis por OSNA y negativo por histología (concordancia de nivel III), y el tercero fue negativo por ambos procedimientos (nivel I concordancia). Este caso revela claramente la existencia de sesgos de localización y por lo tanto, creemos que se debe trasladar de concordancia de nivel III a nivel I. Todos los casos discordantes positivos por OSNA excepto uno se confirmaron por PCR y Western-blot en la alícuota correspondiente. De las dos macrometástasis por OSNA y negativas por histología, uno de los casos correspondía a una inclusión epitelial benigna quística con contenido proteico. En el otro caso, la macrometástasis OSNA fue de 13.000 copias/ μ L, es decir, en el rango de volumen inferior de las macrometástasis.

Tras el análisis de casos discordantes (Tabla II), hubo, por tanto, un solo caso discordante verdadero consistente en una inclusión epitelial benigna, siendo el resto de casos discordantes atribuibles a sesgo de localización.

Tabla I. Resultados sin análisis de casos discordantes

		<i>Histológico</i>			
		<i>Macro</i>	<i>Micro</i>	<i>Neg.</i>	<i>Total</i>
OSNA	Macro	25	2	2	29
	Micro	1	5	4	10
	Neg.	2	2	138	142
Total		28	9	144	181

En ningún caso, las discordancias observadas pudieron ser atribuidas a la curva de aprendizaje propia del nuevo procedimiento.

Tabla II. Resultados tras análisis de discordancias

		Estudio histológico			
		Macro	Micro	Negativo	Total
OSNA	Macro	32 (17,67%)	0	1 (0,55%)	33 (18,23%)
	Micro	0	10 (5,52%)	0	10 (5,52%)
	Negativo	0	0	138 (76,24%)	138 (76,24%)
Total		32 (17,67%)	10 (5,52%)	139 (76,79%)	181

DISCUSIÓN

Los protocolos para el estudio cito/histológico del ganglio centinela muestran escasa sensibilidad para las metástasis de pequeño volumen (micrometástasis y CTA), cuyo valor pronóstico sigue siendo tema de debate (10,11) y la búsqueda histológica meticulosa de estos depósitos por métodos convencionales puede ser demasiado laboriosa y costosa para ser aceptada como protocolo intraoperatorio. Una posible solución a este dilema es la aplicación de un procedimiento molecular recientemente descrito para el diagnóstico intraoperatorio del GC (3,4).

En este trabajo evaluamos la correlación entre el procedimiento OSNA y el procedimiento histológico en 181 casos, procedentes de seis hospitales, obteniéndose una concordancia del 99,45%. Dado que el estudio compara áreas distintas del mismo ganglio (secciones incluidas alternativamente para estudio histológico y molecular) se acepta que algunos depósitos de tumor, especialmente los pequeños, puedan estar presentes en una sección y no en la siguiente, ofreciendo resultados discordantes por el propio diseño del estudio (12).

Ocho de los diez casos inicialmente discordantes en nuestro estudio, después de ser analizados por PCR y Western-blot en la alícuota de seguridad del homogeneizado, se atribuyeron a sesgo de localización. De los dos casos discordantes restantes, uno de ellos fue diagnosticado como macrometástasis por ensayo OSNA y negativo en el estudio histológico, realizándose un Western-blot del homogeneizado y detectándose de nuevo la presencia de proteína CK19. Entendemos por tanto que, aún tratándose de una macrometástasis, se hallaba en el rango inferior del número de copias de esta categoría diagnóstica (13.000 copias/ μ L), y que por tanto, la discrepancia diagnóstica es igualmente atribuible a sesgo de localización. El otro caso fue una inclusión epitelial benigna en el estudio histológico, negativa OSNA aunque mostró un número de copias de ARNm-CK19 > 100 y $< 250/\mu$ L, es decir, correspondiente a CTA. Se trata de un caso excepcional tanto por la rareza de la entidad como por su forma de presentación.

En concordancia con otros estudios recientes, la sensibilidad y especificidad del procedimiento OSNA en nuestro trabajo fueron de 98,2 y 94,8% respectivamente, valores discretamente superiores a los referidos en estudios similares por Tamaki (13), Schem (14) y Visser (15) así como a los referidos por Krishnamurthy (16) quien revisa y compara distintos procedimientos basados en impronta citológica o histológica.

La principal desventaja del método molecular respecto al histológico en nuestro estudio consiste en la imposibilidad de realizar una observación morfológica de las lesiones, de su ubicación en el ganglio y de su medición bidimensional, dato en el que se basa la clasificación del pN. Sin embargo, la tasa de segundas intervenciones (linfadenectomía axilar) por falsos negativos en el diagnóstico intraoperatorio histológico oscila alrededor del 15-25%. Por tanto, creemos que la elevada sensibilidad de la técnica al permitir el estudio de la totalidad del ganglio, así como su reproducibilidad intraoperatoria, constituye un argumento definitivo a favor de su implementación.

Nuestra serie incluye un caso falso positivo verdadero (CTA, aunque pN0 i+ mol) consistente en una inclusión epitelial benigna de morfología infrecuente tanto por su tamaño como por su estructura quística rellena de material proteináceo que, virtualmente, podría haber aumentado los niveles de ARNm-CK19. Sin embargo, la mayor parte de inclusiones epiteliales benignas son de pequeño tamaño y en forma de pequeños acúmulos o nidos, por lo que la cantidad de ácido nucleico que contienen debe quedar por debajo del dintel de positividad del sistema en la mayoría de casos (5,6). Por ello, en nuestra opinión, la posibilidad de falsos positivos atribuibles a esta patología, considerando además su baja incidencia, es excepcional.

En conclusión, los resultados de este estudio sostienen que el procedimiento molecular OSNA es una técnica altamente sensible, específica y reproducible que permite la necesaria estandarización diagnóstica en el área del GC.

Creemos que el método OSNA es, por tanto, una nueva alternativa al diagnóstico histológico del GC que no sólo permite el estudio del ganglio en su totalidad sino también en un tiempo aceptable para su aplicación intraoperatoria.

AGRADECIMIENTOS

A Sonia García del Busto y Mónica Tortajada por su asistencia técnica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cserni G, Amendoeira I, Apostolikas N, Belloep JP, Bianchi S, Bocker W, et al. Discrepancies in current practice of pathological evaluation of sentinel lymph nodes in breast cancer. Results of a questionnaire based survey by the European Working Group for Breast Screening Pathology. *J Clin Pathol* 2004; 57(7): 695-701.

2. Piñero A, Giménez J, Merck B, Vázquez C y Grupo de Expertos. Reunión de consenso sobre la biopsia selectiva del ganglio centinela en el cáncer de mama. Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria. *Rev Senologia Patol Mam* 2007; 20(1): 16-20.
3. 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.
4. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: e63.
5. Norton LE, Komenaka IK, Emerson RE, Murphy C, Badve S. Benign glandular inclusions are rare cause of a false positive sentinel node. *J Surg Oncol* 2007; 95: 593-6.
6. Resetkova E, Hoda SA, Clarke JL, Rosen PP. Benign heterotopic epithelial inclusions in axillary lymph nodes. Histological and immunohistochemical patterns. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127: e25-27.
7. Bostick PJ, Chatterjee S, Chi DD, Huynh KT, Giuliano AE, Cote R, et al. Limitations of specific reverse-transcriptase polymerase chain reaction targets in the detection of metastases in the lymph nodes and blood of breast cancer patients. *J Clin Oncol* 1998; 16: 2632-40.
8. Chu PG, Weiss LM. Keratin expression in human tissues and neoplasm. *Histopathology* 2002; 40: 403-39.
9. Sobin LH, Wittekind C, publishers. *TNM classification of malignant tumors*. 6ª ed. Ed.: Wiley-Liss; April 2002.
10. van Deurzen CH, de Boer M, Monnikhof EM, Bult P, van der Wall E, Tjan-Heijnen VC, et al. Non-sentinel lymph node metastases associated with isolated breast cancer cells in the sentinel node. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100: 1574-80.
11. Tan LK, Giri D, Hummer AJ, Panageas KS, Brogi E, Norton L, et al. Occult axillary node metastases in breast cancer are prognostically significant: results in 368 node-negative patients with 20-year follow-up. *J Clin Oncol* 2008; 26: 1803-9.
12. Julian TB, Blumencranz P, Deck K. Novel intraoperative molecular test for sentinel lymph node metastases in patients with early-stage breast cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26: 3338-45.
13. 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 multicenter trial using the one-step-nucleic-acid-amplification assay. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 2879-84.
14. 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.
15. Visser M, Jiwa M, Horstman A, Brink AA, Pol RP, van Diest P, et al. Intra-operative rapid diagnostic method based on mRNA CK19 expression for the detection of lymph node metastases in breast cancer. *Int J Cancer* 2008; 22: 2562-7.
16. Krishnamurthy S, Meric-Bernstam F, Lucci A, Hwang RF, Kuerer HM, Babiera G, et al. A prospective study comparing touch imprint cytology, frozen section analysis, and rapid cytokeratin immunostain for intraoperative evaluation of axillary sentinel lymph nodes in breast cancer. *Cancer* 2009; 115: 1555-62.