



UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA

Caracterización de la estadificación molecular en carcinoma de colon. Correlación clínico-histológica

Iban Aldecoa Ansórrregui



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 3.0. Spain License.**

INTRODUCCIÓN

Introducción

1. Cáncer colorrectal: concepto

El cáncer colorrectal (CCR) se define como toda neoplasia epitelial maligna primaria del intestino grueso y recto. El cáncer de colon excluye el recto y comprende los carcinomas desde la válvula ileocecal hasta la unión rectosigmoidea¹. La clasificación del CCR lo divide en varios tipos histológicos (adenocarcinoma, adenocarcinoma mucinoso, carcinoma de células en anillo de sello, carcinoma neuroendocrino de alto grado, carcinoma neuroendocrino de célula grande/pequeña, carcinoma escamoso, carcinoma adenoescamoso, carcinoma medular y carcinoma indiferenciado)^{2,3}.

1.1. Epidemiología

El CCR constituye la segunda neoplasia más frecuente en los países desarrollados cuando se consideran hombres y mujeres conjuntamente, siendo el tercer cáncer más frecuente en varones, por detrás del de próstata y pulmón, y el tercero en mujeres, después del de mama y el de pulmón⁴. Según datos de la Sociedad Americana contra el Cáncer, se estima que en Estados Unidos de América se diagnosticarán durante 2016 unos 134.490 nuevos casos de CCR (95.270 de ellos carcinomas de colon) y, a pesar de los importantes avances en su tratamiento, representará la segunda causa global de muerte por cáncer, con 49,190 muertes estimadas en 2016⁴. La mortalidad por CCR ha presentado una tendencia descendente en la últimas décadas⁴, debido en parte a la introducción de los programas de cribado poblacional, los cuales han demostrado tasas aceptables de efectividad y aceptación⁵.

En España, el CCR representa el tumor maligno de mayor incidencia, con 28.500 a 33.800 nuevos casos anuales, según la Asociación Española Contra el Cáncer⁶. Se calcula una incidencia de 32.240 pacientes al año, siendo responsable de 14.700 fallecimientos y una prevalencia a cinco años de 89.705 casos, según datos de la Sociedad Española de

Oncología Médica⁷. Un 70-80% de los tumores se diagnostican entre los 65 y los 75 años, y son esporádicos. Los casos que aparecen a edades tempranas suelen estar asociados a formas hereditarias, siendo las más frecuentes los síndromes polipósicos (1%), el síndrome de Lynch o CCR hereditario no asociado a poliposis (2-5%), y el CCR asociado al gen *MUTYH* (1%). En un 20-25% de casos existe una agregación familiar del CCR, sin que se haya identificado un componente hereditario bien establecido, conocido como CCR familiar⁸.

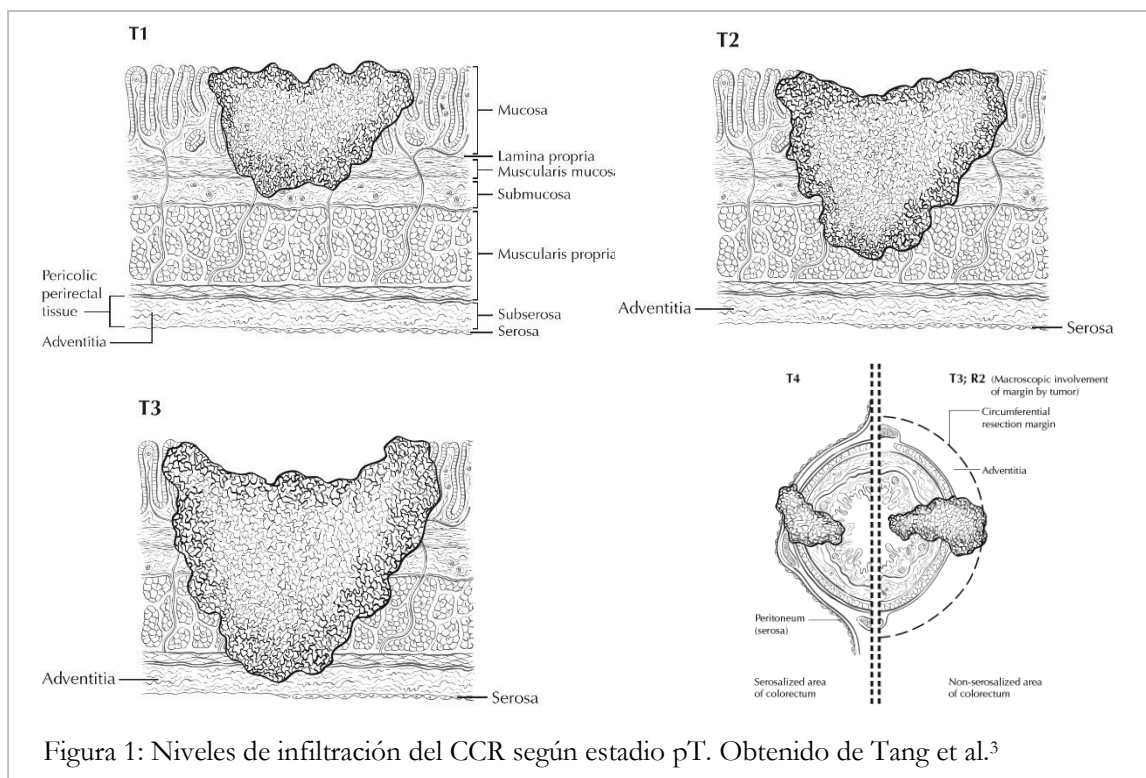
2. Modelo de progresión del cáncer de colon

2.1. Estadificación

La estadificación patológica del CCR, al igual que otras neoplasias epiteliales, se basa en tres pilares fundamentales: el tamaño tumoral (referenciado como pT), la afectación de ganglios linfáticos regionales (pN) y la presencia o ausencia de metástasis (pM)^{3,9}.

2.1.1. Tamaño tumoral

En el CCR, a diferencia de otros carcinomas como la mama o el pulmón, la variable T no se basa en tamaño propio del tumor, sino en el grado de infiltración de las estructuras de la



pared colónica. Así, un tumor pT1 infiltra únicamente la submucosa, el pT2 la muscular propia de la pared, el pT3 el tejido adiposo pericolónico y el pT4 infiltra el peritoneo visceral (pT4a) o directamente infiltra órganos o estructuras anatómicas adyacentes (pT4b)(Figura 1).

2.1.2. Estadio ganglionar

En el CCR la afectación ganglionar se evalúa mediante estudio histológico de los ganglios linfáticos (GLs) aislados en la grasa pericolónica o perirrectal de una pieza de resección quirúrgica. El estadio patológico ganglionar pN se obtiene tras el análisis con el microscopio óptico de cada uno de los GLs, del que se obtiene el número de GLs con afectación neoplásica de entre el total de GLs disecados de la pieza quirúrgica. El estadio ganglionar en el CCR se divide en: ausencia de afectación de GLs (pN0), metástasis a un GL (pN1a), a dos o tres (pN1b), entre cuatro y seis (pN2a), a siete o más ganglios (pN2b). En el caso de que no se detecte afectación en GLs, pero se observen depósitos neoplásicos en tejidos pericolónicos, se estadía como pN1c. Cuando se aíslan menos de 12 GLs en una pieza quirúrgica y son todos histológicamente negativos, el estadio es pNx, al no poderse establecer un estadio pN0 con garantías, dada la baja sensibilidad del estudio histológico.

2.1.3. Metástasis

El estadio M (metástasis) se subclasifica en: ausencia de metástasis (pM0), se desconoce la presencia de metástasis (pMx), la afectación de un único órgano o localización (hígado, pulmón, ovario o GLs no regionales; pM1a), y la afectación de más de una de estas localizaciones u otras o la afectación peritoneal (pM1b).

3. Manejo del cáncer de colon

3.1. Estudios de cribado

La mortalidad por CCR ha presentado una tendencia descendente en las últimas décadas⁴ debido en parte a la introducción de los programas de cribado poblacional, los cuales han demostrado tasas aceptables de efectividad y aceptación⁵. En España, el programa de cribado del CCR está dirigido a la población de riesgo medio (individuos de ≥ 50 años sin factores de riesgo personales o familiares adicionales). Así, el cribado se realiza en individuos entre los 50 y 69 años de edad, y se basa en la detección de sangre oculta en heces con un intervalo bienal¹⁰. Este programa se encuentra en proceso de expansión con 2.279.547 personas incluidas (20%) en 2013, pero con el objetivo de alcanzar el 50% para el año 2015¹⁰. El programa se inició en Cataluña en el año 2.000, y se ha ido extendiendo progresivamente hasta estar presente, al menos como estudio piloto, en todas las comunidades autónomas en el año 2014¹⁰. De hecho, hay comunidades en las que el programa de cribado está implantado al 100%, como se comunicó en Noviembre de 2014 en el País Vasco.¹¹

Los programas de cribado de base poblacional permiten la detección de CCR precoces y pólipos de alto riesgo⁵; la confirmación de su diagnóstico se fundamenta en el estudio colonoscópico y la evaluación histológica.

3.1.1. Implicaciones poblacionales

Los programas de cribado poblacional se fundamentan en la prevención secundaria y tienen como objetivo la detección de patologías prevalentes en estadios precoces, que en conjunción con estrategias terapéuticas efectivas, consiguen reducir la morbilidad y mortalidad asociadas a las mismas.

3.1.2. Técnica

En el caso del CCR, las estrategias de cribado se dividen en dos grandes grupos: las técnicas de estudio de heces y las evaluaciones estructurales, tales como la colonoscopia o la sigmoidoscopia⁵. Las primeras detectan principalmente neoplasias infiltrantes, mientras que las segundas identifican también lesiones premalignas¹².

3.1.3. Programa de Cribado de Cáncer Colorrectal Nacional

En la actualidad, en la mayoría de comunidades autónomas del estado Español el cribado va dirigido a la población entre 50 y 69 años y se realiza mediante la prueba de detección de sangre oculta en heces de tipo inmunoquímico con periodicidad bienal. La Estrategia del Cáncer del Sistema Nacional de Salud aprobó en el año 2009 la propuesta de realizar este esquema de cribado a nivel estatal, aunque ya desde el año 2000 distintas comunidades autónomas tenían en marcha distintos tipos de programas piloto¹³.

3.1.4. Programa de Cribado de Cáncer Colorrectal en Cataluña

3.1.4.1. Implicación del Hospital Clínic en el Programa de Cribado de Cáncer Colorrectal

El Hospital Clínic de Barcelona y el Hospital Parc de Salut Mar actúan como centros coordinadores del *Programa de Detecció Precoç de Càncer Colorectal de Barcelona*, por designación del Departament de Salut de la Generalitat de Catalunya, desde el año 2009. Ambos centros constituyeron una oficina técnica para gestionar el programa en la ciudad de Barcelona y establecieron cuatro unidades de cribado en los hospitales de referencia de las cuatro áreas integrales de salud de la ciudad (Esquerra-Hospital Clínic, Dreta-Hospital de Sant Pau, Litoral-Parc de la Salut Mar, i Nord-Hospital Vall d'Hebron)¹⁰.

3.2. Estudios diagnósticos

3.2.1. Colonoscopia

La evaluación mediante colonoscopia se basa en la introducción de un endoscopio por el ano u otro estoma para la evaluación de la mucosa colónica, la detección de lesiones o alteraciones morfológicas, y la toma de muestras para su evaluación histológica, con objetivos diagnósticos y/o terapéuticos. La colonoscopia retrógrada para la evaluación completa del colon fue introducida a mediados del año 1969 y, desde entonces, ha presentando una gran evolución técnica y procedimental hasta su extensión actual¹⁴.

3.2.1.1. Diagnóstico y criterios de resecabilidad de lesiones sospechosas de malignidad

3.2.1.1.1. Estudio histológico

Las muestras tisulares obtenidas por endoscopia se sumergen en distintos fijadores histológicos, principalmente formaldehído, inmediatamente después de la obtención y se remiten, entre otros, al Servicio de Anatomía Patológica. A estas muestras se realiza la evaluación macroscópica, se procesan y posteriormente se procede a su evaluación histológica que dará el diagnóstico de la lesión. Tras ello, y para suplementar la información requerida para el manejo asistencial, se puede proceder a la realización de estudios adicionales, tales como técnicas inmunohistoquímicas o moleculares.

3.2.1.1.2. Indicadores de malignidad

Normalmente, las lesiones epiteliales en la mucosa colónica se presentan como lesiones exofíticas o ulceradas. Las lesiones precursoras, tales como los adenomas, tienen una morfología polipoide intraluminal, ya sea pediculada o sésil. Sobre estas pueden desarrollarse carcinomas infiltrantes. Los carcinomas también se pueden presentar directamente como lesiones ulceradas, planas y/o estenosantes de tamaño variable que pueden llegar a impedir el paso del endoscopio^{3,15,16}.

Se han descrito distintos indicadores que pueden ser evaluados durante la endoscopia y que pueden revelar el potencial maligno subyacente de una lesión durante la misma, como el tamaño, la consistencia, la morfología, etc.¹⁶. Se han desarrollado recientemente múltiples guías y protocolos de consenso para el manejo de lesiones polipoides colorrectales. Por ejemplo, la asociación de Coloproctología de Reino Unido e Irlanda ya indicó en 2013 las características de lesiones polipoides consideradas con mayor riesgo de presentar un componente infiltrante. Estas incluyen lesiones de mayor tamaño o morfología plana, con signos de ulceración o aumento de consistencia, con tallo amplio, con patrones morfológicos y glandulares tipo París 0-IIc y Kudo patrón pit V, con expansión lateral de la lesión o el no alzamiento de la lesión al inyectar suero salino en la submucosa. No obstante, es infrecuente hallar todas estas características en un pólipo concreto. Además, hay estudios que han observado que características tales como el tamaño de la lesión polipoide o las características vellosas pueden no predecir la malignidad, remarcando la debilidad del potencial predictivo de algunas de estas variables¹⁷.

3.2.1.2. Exéresis endoscópica de lesiones sospechosas de malignidad

Debido a que las características endoscópicas de una lesión colónica no siempre predicen su malignidad, en la actualidad es necesaria la realización de evaluaciones adicionales. La principal se basa en el estudio histológico de las lesiones, que ofrecerá el diagnóstico de certeza.

Dependiendo de las características de la lesión, la actitud endoscópica puede variar. En el caso de que sea posible resecar completamente una lesión por vía endoscópica, bien por presentar un tallo estrecho, no presentar un tamaño excesivo o estar en una localización accesible, se opta por la resección endoscópica utilizando la técnica más adecuada (polipectomía, mucosectomía, etc.)^{16,18}. En estos casos, se remite para estudio histopatológico la lesión completa, bien intacta o fragmentada, según la dificultad de la

resección endoscópica. La evaluación histológica no debe limitarse únicamente a la caracterización histopatológica de la lesión, sino que debe otorgar información pronóstica del potencial de recidiva local o de metástasis ganglionar de la misma. En el caso de la presencia de un carcinoma infiltrante, se debe reportar el tamaño del carcinoma, el tamaño y tipo de adenoma sobre el que se origina, el nivel de invasión en la submucosa (en mm), el estado de los márgenes de resección laterales (mucosos) y profundo, así como la distancia del componente infiltrante a los mismos, el grado histológico del componente infiltrante y la presencia y grado de tumor budding e invasión linfovascular. Con estos datos se decidirá entre un abordaje conservador con control endoscópico o el manejo intervencionista mediante resección local submucosa (sobre todo en lesiones rectales) o, incluso, resección quirúrgica del tramo colónico afecto^{16,18}.

En el caso de que las características endoscópicas impidan una exéresis completa o si se sospecha la existencia de un componente infiltrante, se puede optar por la realización de una biopsia de la lesión. Si el estudio histológico revela la presencia de malignidad, se procederá al tratamiento quirúrgico de la lesión^{16,18}.

3.2.1.3. Marcado de lesiones sospechosas de malignidad. Seguimiento endoscópico de lesiones reseçadas

Tal y como se ha indicado en el apartado anterior, no es posible dilucidar de manera sistemática el grado de displasia o la presencia de malignidad en una lesión polipoide colorrectal mediante la evaluación endoscópica¹⁶⁻¹⁸. Por tanto, no es inusual la realización de colonoscopias reiteradas para reevaluar el área de la resección endoscópica de una lesión benigna con el fin de asegurar su exéresis completa o de un carcinoma en el que se decide realizar un manejo conservador sin cirugía complementaria¹⁶. Por ello, con la expansión de los procedimientos colonoscópicos reiterados, surgió la consiguiente necesidad de localizar con precisión el lecho de resección de lesiones extraídas endoscópicamente. Se ha descrito

una amplia variedad de técnicas de localización, desde las pruebas de imagen hasta las colocación de clips o inyección de sustancias colorantes en el lecho lesional¹⁹.

3.2.1.3.1. Tatuaje colonoscópico

3.2.1.3.1.1. *Introducción. Concepto*

La realización del tatuaje endoscópico se basa en la inyección de sustancias colorantes en la pared colorrectal adyacente a una lesión, con el objetivo de identificarla en subsiguientes exploraciones endoscópicas o quirúrgicas. Entre las diferentes técnicas de localización, la inyección submucosa de colorantes, tales como la tinta china, han mostrado resultados aceptables¹⁹.

El tatuaje durante la colonoscopia tiene tres propósitos¹⁶:

1. Permitir un control fiable de las cicatrices o áreas en las que asentaron lesiones extraídas por vía endoscópica.
2. Localizar áreas que fueron definidas como de potencial patológico indeterminado o que no pudieron ser evaluadas de manera óptima, para su posterior re-evaluación en sucesivas endoscopias.
3. Facilitar al cirujano la localización exacta de las lesiones, en el supuesto de que se requiera su excisión quirúrgica.

Fue en 1958 cuando Sauntry et al describieron por vez primera la técnica del tatuaje utilizando colorante azul en la base de lesiones polipoides²⁰. Tras ello, Knoernschild reportó una serie de 190 pacientes que recibieron tatuaje endoscópico²¹, y Ponsky et al propusieron utilizar el tatuaje endoscópico de las lesiones colónicas para su localización intraoperatoria²². Este procedimiento ha presentado una gran expansión y asentamiento, si bien su realización no ha sido completamente estandarizada.

3.2.1.3.1.2. Materiales

Se han investigado múltiples materiales tales como azul de metileno, índigo carmín, azul de toluidina, limpazurina, hematoxilina, eosina o verde de indiocianina²³. Muchos de ellos poseen semividas cortas, de hasta 14 días, lo que limita su uso en intervalos temporales amplios²⁴. Por ello, la sustancia más utilizada como material para el tatuaje en la actualidad se basa en las suspensiones de partículas de carbón en soluciones históricamente denominadas “tinta china” o “indian ink”²⁵. Se compone de una suspensión coloidal de partículas de carbón en una solución de sustancias orgánicas e inorgánicas utilizadas como diluyentes estabilizantes y surfactantes²⁶. Aunque se han comercializado ya en soluciones esterilizadas de uso individual, denominadas Spot²⁷, las suspensiones de tinta china pueden ser esterilizadas para su uso mediante autoclavado o mediante el uso de filtros bacteriostáticos^{26,28}.

3.2.1.3.1.3. Técnica

Las técnicas de tatuaje endoscópico no se encuentran completamente estandarizadas, aunque sí constan de unas directrices generales establecidas en ámbitos locales, regionales e incluso internacionales, aunque el punto crítico es el desarrollo de protocolos consensuados en cada grupo multidisciplinar¹⁶. En esencia, se procura tatuar en la parte distal (anal) de la lesión en tres o cuatro cuadrantes, que permiten y aseguran la visión serosa del tatuaje en el borde antimesentérico. Es habitual la inyección previa de suero salino con el objetivo de observar la formación de una bulla o “*bleb*”-submucosa para asegurarse que la tinta se inyecta en la submucosa y, por lo tanto, la aguja no ha tenido un trayecto superficial o demasiado profundo (transmural)²⁹.

3.2.1.3.1.4. Riesgos

El tatuaje endoscópico no es una técnica exenta de riesgos. Algunas preparaciones de tinta china contienen sustancias tales como etilenglicol, fenol y productos de origen animal (por ejemplo, gelatinas) que pueden causar reacciones inflamatorias tisulares²⁶. De hecho,

han sido reportadas complicaciones relevantes debido al uso de tinta china, como la peritonitis focal, el desarrollo de pseudotumores inflamatorios o abscesos, e íleos posoperativos por adhesiones³⁰⁻³⁴, si bien las complicaciones clínicamente importantes son raras³⁵.

3.2.1.3.1.5. Beneficios adicionales del tatuaje endoscópico – estadificación

La pared intestinal presenta una gran densidad de vasos linfáticos para la absorción y drenaje de los nutrientes que transcurren por el tubo digestivo. Este sistema linfático sirve asimismo para el drenaje de sustancias exógenas y patógenos, que viajan fagocitadas por histiocitos o bien diluidas. Los GLs regionales, ubicados en la grasa pericolónica o perirrectal, actúan como filtro de los mismos. Debido a la expansión de la utilización del sistema de tatuaje endoscópico y tras aumentar la experiencia en su uso, se ha constatado que una fracción de tinta china no permanecía en la submucosa sino que entraba en el torrente linfático, llegaba a los GLs regionales y era allí fagocitada por histiocitos, marcando no sólo el área submucosa de manera prolongada, sino también los GLs regionales de drenaje³⁶. Esto conllevó el desarrollo de varios estudios para valorar el impacto del tatuaje endoscópico en la búsqueda de los GLs³⁶⁻⁴².

Estos estudios han arrojado datos contradictorios sobre el impacto de los tatuajes submucosos prequirúrgicos en el rendimiento de la obtención de GLs³⁷⁻⁴⁰. Las diferencias metodológicas en el tipo y el número de GLs estudiados, así como los diferentes objetivos de los estudios, pueden haber sido la causa de las discrepancias. Por ejemplo, mientras algunos autores han utilizado la tinta china para intentar identificar ganglios linfáticos centinela (GLC), abogando por su utilidad de encontrar GLs metastásicos^{36,41,42}, otros la han utilizado para mejorar el muestreo de ganglios linfáticos y así aumentar el número de ganglios aislados por caso^{37,38}. Asimismo, han sido publicados estudios donde se intenta constatar la falta de beneficio adicional del tatuaje endoscópico en la búsqueda de GLs⁴⁰.

3.2.1.3.2. Otras técnicas de marcaje colonoscópico

Además del tatuaje endoscópico, existen múltiples técnicas desarrolladas y aplicadas con el objetivo de determinar la localización de una lesión durante procedimientos quirúrgicos o endoscópicos posteriores, aunque pueden poseer distintos niveles de complejidad. Por ejemplo, la distancia a la lesión desde el ano medida durante endoscopia flexible puede no ser reproducible^{43,44}. También es imprecisa la estimación de la localización basada en los hallazgos de la radiografía de contraste de bario o aparente localización colonoscópica, incluso con fluoroscopia concurrente o la realización de colono-TAC^{24,45}. La realización de una colonoscopia intraoperatoria para localizar la lesión es un procedimiento complejo que prolonga el tiempo de anestesia, distiende el intestino y requiere de la presencia de un equipo de endoscopia en quirófano^{46,47}. La colocación endoscópica de clips metálicos es una solución a corto plazo, ya que estos clips se expulsan espontáneamente a los 7-14 días, por lo que no puede ser una opción en el contexto del seguimiento colonoscópico, ya que la subsiguiente colonoscopia puede realizarse hasta un año después. Asimismo, debido a que los clips no se pueden ver desde la serosa, carecen de utilidad para el cirujano laparoscópico, a menos que exista la posibilidad de realizar una ecografía intraoperatoria para identificar el clip⁴⁸.

3.3. Estudios de extensión y seguimiento

3.3.1. Estudios de imagen

La *National Comprehensive Cancer Network* recomienda la realización de TAC toraco-abdomino-pélvicas cada 6-12 meses en el seguimiento de los pacientes afectados de CCR localizado (estadios II y III) con alto riesgo de recidiva tras el tratamiento quirúrgico y adyuvante⁴⁹. Otras pruebas de imagen, como la realización de ecografías, PET-TAC o RMN no son realizadas de forma rutinaria⁵⁰.

3.3.2. Marcadores, estudios moleculares y técnicas de investigación

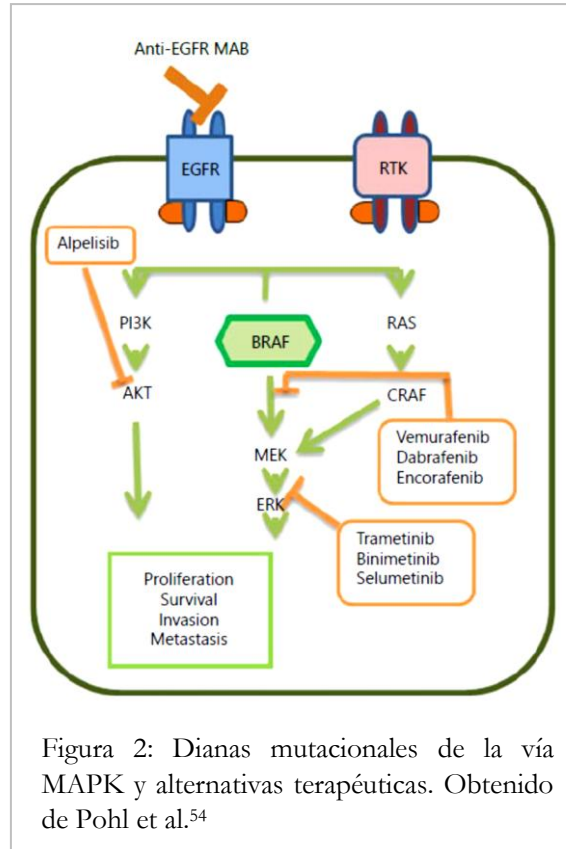
3.3.2.1. Antígeno carcinoembrionario

El antígeno carcinoembrionario (CEA) es una glicoproteína de membrana que pertenece a una gran familia de 29 genes de los cuales sólo 18 son expresados⁵¹. La monitorización de sus niveles en sangre han demostrado ser de utilidad para predecir la recidiva del CCR^{49,52}. Por ello, las guías actuales de la *National Comprehensive Cancer Network* recomiendan la determinación de niveles de CEA cada 3-6 meses en los primeros dos años tras la resección de un CCR estadio II ó III, y después continuar cada 6 meses hasta cumplir los 5 años de seguimiento⁴⁹.

3.3.2.2. Biopsia líquida

En los últimos años se han ido desarrollando técnicas que han buscado evaluar y caracterizar el componente neoplásico que se presentan en la sangre periférica de pacientes oncológicos⁵³⁻⁵⁵. Este componente neoplásico se puede presentar tanto como células tumorales circulantes (CTC) o clusters celulares, o segmentos de ADN y ARN circulante en diversas formas (desde exosomas hasta microARNs)^{53,55}. Las diferentes técnicas desarrolladas se enfocan en el estudio de un sustrato concreto y presentan distintas características⁵³⁻⁵⁵. El análisis de CTC en pacientes con CCR se encuentra actualmente en proceso de investigación⁵⁵. La ventaja del estudio de CTC es que permite la evaluación de las mismas a múltiples niveles. Por una parte, permite la cuantificación nominal del número de células circulantes, lo cual puede ser correlacionado con el pronóstico y la respuesta al tratamiento, como se está intentando dilucidar con los ensayos clínicos VISNU-1 y VISNU-2⁵⁵. Por otra parte, el obtener estas células permite su posterior caracterización tanto proteica como génica, pudiendo realizarse cultivos celulares o estudios de expresión proteica o análisis mutacionales genéticos, lo cual puede aportar datos de pronóstico o de resistencia terapéutica⁵⁵⁻⁵⁷.

Por otro lado, mediante la evaluación de ADN circulante tumoral (*circulating tumor DNA* o ctDNA) se ha mostrado que en pacientes con CCR se pueden evaluar múltiples alteraciones de ADN tales como mutaciones de oncogenes y genes tumores supresores, inestabilidad de microsátelites, pérdidas de heterocigosidad, hipermetilación de promotores génicos y mutaciones de ADN mitocondrial⁵³. Muchas de estas evaluaciones se están realizando en el contexto del tratamiento de pacientes



metastásicos potencialmente tratables con fármacos anti-EGFR, mediante la evaluación no solo del estatus mutacional de los genes *RAS* en múltiples exones, sino también en otras potenciales dianas de la vía de proteína quinasas activadas por mitógenos (MAPK) tales como mutaciones en *BRAF*, *PIK3CA* o amplificaciones de *HER2/ERBB2* o *MET*^{53,54}. Eso puede ser especialmente útil para la selección de alternativas terapéuticas adicionales enfocadas a estas alteraciones (Figura 2)⁵⁴, así como en la monitorización de pacientes con CCR que están recibiendo terapias anti-EGFR⁵⁸, aunque en la actualidad presentan retos de cara a mejorar su sensibilidad y especificidad^{53,59,60}.

3.4. Manejo terapéutico

El manejo terapéutico de los pacientes con CCR es complejo. Se basa, en gran medida, en la realización de una exéresis de la neoplasia, bien endoscópica o quirúrgica, con la realización de diversos esquemas quimioterápicos principalmente adyuvantes aunque también neoadyuvantes en cáncer de recto y algunos casos concretos de cáncer de

colon^{61,62}. Se debe tener en cuenta que el enfoque, no solo terapéutico sino también de seguimiento y diagnóstico, varía según el contexto clínico del paciente, desde diagnósticos realizados en estudios de cribado poblacional hasta pacientes con riesgo genético sospechado o confirmado, y dependiendo de la localización y extensión de la neoplasia.

3.4.1. Manejo quirúrgico

3.4.1.1. Tumor primario

3.4.1.1.1. Indicaciones

Siempre que un CCR se encuentre localizado, la elección terapéutica principal es la exéresis quirúrgica con linfadenectomía en bloque^{61,62}. En caso de que la neoplasia se localice en un pólipo pedunculado (y, en menor medida, sésil), que haya sido resecado endoscópicamente de manera completa con márgenes libres, que presente una histología favorable sin factores de alto riesgo, se puede considerar que el tratamiento endoscópico es suficiente y recomendar únicamente un seguimiento endoscópico^{16,18,61,62}. En casos de tumores rectales, se puede considerar la realización de quimioterapia y/o radioterapia neoadyuvante seguida de la exéresis quirúrgica en un segundo tiempo^{61,62}.

3.4.1.1.2. Técnicas

Durante muchos años la cirugía abierta ha sido la opción predominante para la exéresis de neoplasias colorrectales. El auge de la laparoscopia, que consiste en la inserción de trócares en varios puntos abdominales que permiten la utilización de instrumental quirúrgico y herramientas de video, ha desplazado progresivamente la cirugía abierta^{63,64}. De hecho, según la *National Comprehensive Cancer Network*, la técnica laparoscópica puede ser considerada bajo los siguientes preceptos⁶¹⁻⁶³: el cirujano responsable tiene suficiente experiencia en intervenciones laparoscópicas colorrectales^{65,66}, no se trata de una lesión localmente avanzada, no hay evidencia de obstrucción intestinal aguda o perforación por cáncer, requiere una minuciosa exploración abdominal⁶⁶ y el marcaje preoperatorio de las lesiones debe ser considerado.

3.4.1.2. Resección de metástasis

A pesar de la presencia de enfermedad metastásica, se puede considerar la exéresis de lesiones metastásicas hepáticas o pulmonares, siempre y cuando el tumor primario se pueda resear o haya sido ya resecado completamente^{61,62}. En el caso de las metástasis hepáticas, la resección quirúrgica es el tratamiento de elección en lesiones resecables sin evidencia de afectación extrahepática, pudiendo utilizarse técnicas como la embolización portal venosa preoperatoria para permitir la resecabilidad en caso en los que el remanente hepático sería insuficiente^{61,62,67-70}. Por lo que respecta a las metástasis pulmonares, su resección puede realizarse a pesar de la presencia de metástasis extrapulmonares adicionales⁷¹⁻⁷³.

3.4.2. Manejo adyuvante

3.4.2.1. Tratamiento quimioterápico

En la actualidad, existen múltiples esquemas para el tratamiento adyuvante de los pacientes con CCR, los cuales se basan en fármacos como irinotecan, oxaliplatino, capecitabina o 5-fluorouracilo, así como fármacos biológicos como bevacizumab, cetuximab o panitumumab^{54,74-77}. Su uso se recomienda en carcinomas de colon T3N0M0 de alto riesgo así como en T4N0M0 y estadios III, y se puede considerar en T3N0M0 sin inestabilidad de microsatélites⁷⁴⁻⁷⁷.

El manejo adyuvante del CCR estadio IIA es uno de los retos más complejos de manejo terapéutico, debido a que no hay suficiente evidencia para apoyar el uso rutinario de la quimioterapia adyuvante, teniendo en cuenta su toxicidad y costes asociados. Además, se desconoce el potencial beneficio del tratamiento adyuvante para pacientes con micrometástasis en el contexto de paciente con CCR estadio I-II^{78,79}.

4 Implicaciones pronósticas y retos actuales de la estadificación neoplásica

4.1. Características del tumor primario

La evaluación histológica y molecular del tumor primario otorga abundante información con implicación pronóstica y predictiva. Debido al avance del conocimiento, se han ido añadiendo a los factores de riesgo clásicos otras características y factores que modulan el papel de los mismos.

4.1.1. *Tamaño y volumen tumoral*

Como ya se ha comentado previamente, uno de los factores principales es el estadio tumoral valorado mediante el esquema de pTNM. Aunque en el CCR el estadio pT se basa en el nivel de infiltración local del tumor, estudios recientes han recalcado que el volumen tumoral *per se* puede ser importante en otros modelos de cáncer digestivo, como por ejemplo el cáncer gástrico⁸⁰. Asimismo, puede que no solo la profundidad de invasión, sino también la extensión de la misma sean relevantes. De hecho, se ha indicado recientemente que en carcinoma pT1, es decir, con infiltración únicamente de la submucosa, la extensión lateral o tamaño y el área del tumor puede tener mayor relevancia a la hora de determinar metástasis ganglionares que la profundidad máxima⁸¹. Esto puede deberse a que la submucosa superficial tiene una mayor densidad de capilares linfáticos, por lo que tumores superficiales pero grandes y extensos o anchos, pueden tener una mayor área de contacto con el sistema de drenaje linfático y, por tanto, mayores probabilidades de derivar en metástasis ganglionares⁸¹.

4.1.2. *Características histológicas*

Pero no sólo es importante el volumen neoplásico, sino las características histológicas del mismo. Se han sugerido distintos sistemas de gradación histológica, pero no se tiene en la actualidad un sistema de gradación completamente estandarizado³. Por ello, está extendida la estratificación en dos grupos a la hora de definir el grado tumoral: tumores de bajo grado

(bien o moderadamente diferenciados) y tumores de alto grado (pobrementemente diferenciados e indiferenciados). Aunque la mayoría de adenocarcinomas colorrectales son moderadamente diferenciados, la presencia de componentes de alto grado pueden conllevar un peor pronóstico⁸². Los componentes de alto grado pueden tener morfologías variadas: carcinomas mucinosos, en anillo de sello, cribiformes, micropapilares, de célula pequeña, indiferenciados e incluso adenocarcinomas mixtos con componentes escamosos o neuroendocrinos³. De todos modos, por convención solo tres de estos son definitorios *per se* de ser de alto grado: carcinomas en anillo de sello, de células pequeñas y tumores indiferenciados. Sólo los dos primeros han demostrado un peor pronóstico, independientemente del estadio tumoral^{83,84}.

Asimismo, no sólo es importante la profundidad y extensión de la neoplasia, sino las características de este borde infiltrante. El término de *tumor budding* define el concepto de la capacidad de una neoplasia de poder infiltrar en forma de nidos sueltos o células aisladas indiferenciadas en su borde infiltrante, denominadas *buds*⁸⁵. Como indican Koelzer et al⁸⁶, basándose en estudios retrospectivos bien diseñados, el *tumor budding* ha demostrado ser un predictor de riesgo adverso en CCR en tres contextos clínicos concretos: 1.- pólipos malignos, donde la presencia de *tumor budding* es un predictor de metástasis ganglionares e indica la necesidad de realizar resecciones quirúrgicas; 2.- tumores en estadio II, donde es un indicador pronóstico adverso que puede contribuir en la selección de pacientes para terapia adyuvante; y 3.- en el entorno preoperatorio, donde la presencia de *tumor budding* puede ayudar a la selección de pacientes con cáncer rectal de alto riesgo que requieren terapias neoadyuvantes. De todos modos, su evaluación y estratificación requieren todavía de consenso y estandarización.

Otros de los factores de riesgo clásicos son los fenómenos de infiltración de estructuras que nutren e inervan el segmento colónico afecto, y mediante las cuales la neoplasia puede

extenderse. Estas son las invasiones vasculares y perineurales³, y ambas han demostrado un peor pronóstico y una mayor probabilidad de metástasis ganglionares⁸⁷⁻⁹¹. De hecho, la afectación de estructuras venosas de gran calibre (con pared muscular o fibras elásticas) más allá de muscular propia ha demostrado ser un factor pronóstico adverso mediante análisis multivariante en múltiples estudios y es un factor de riesgo de metástasis hepáticas⁹². Se recomienda el uso de tinciones específicas para detección de fibras elásticas en muestras de CCR⁹³.

4.1.3. Características moleculares

En los últimos años ha cobrado especial relevancia la clasificación del CCR atendiendo a sus alteraciones moleculares. Un trabajo reciente de Guinney et al⁹⁴ ha intentado crear una clasificación de consenso basándose en subtipos moleculares, creando cuatro grupos (*consensus molecular subtypes* -CMSs-): CMS1 (*microsatellite instability immune*, 14%), casos hipermutados, con inestabilidad de microsatélites y marcada reacción inmunológica; CMS2 (*canonical*, 37%), neoplasias con fenotipo epitelial, con activación de las vías de señalización de WNT y MYC; CMS3 (*metabolic*, 13%), neoplasias con fenotipo epitelial con marcada disregulación metabólica; y CMS4 (*mesenchymal*, 23%), neoplasias con marcada activación del factor transformante de crecimiento β (TGF- β), con invasión estromal y angiogénesis (Figura 3).

De todos modos, en el contexto del CCR sólo unos pocos biomarcadores han mostrado su utilidad clínica, al disponer de escasas dianas terapéuticas. Los biomarcadores utilizados son las alteraciones en los genes *BRAF*, *RAS* y la inestabilidad de microsatélites (*microsatellite instability* – MSI)⁹⁴. Aunque algunas de estas alteraciones están íntimamente ligadas a CMS concretos (como las MSI y el CMS1), otras, como la ausencia de mutaciones en *RAS*, pertenecen a un cluster terapéuticamente homogéneo pero que no puede identificarse con un CMS concreto.

| CMS1 MSI immune | CMS2 Canonical | CMS3 Metabolic | CMS4 Mesenchymal |
|------------------------------------|------------------------|--------------------------------------|---|
| 14% | 37% | 13% | 23% |
| MSI, CIMP high, hypermutation | SCNA high | Mixed MSI status, SCNA low, CIMP low | SCNA high |
| <i>BRAF</i> mutations | | <i>KRAS</i> mutations | |
| Immune infiltration and activation | WNT and MYC activation | Metabolic deregulation | Stromal infiltration, TGF- β activation, angiogenesis |
| Worse survival after relapse | | | Worse relapse-free and overall survival |

Figura 3: Características de los CMPs, incluyendo frecuencia, pronóstico y características genéticas y metabólicas. Obtenido de Guinney et al.⁹⁴

La MSI es un fenómeno en el cual, debido a alteraciones genéticas o epigenéticas, los sistemas de reparación de ADN se ven alterados. Estos repercuten especialmente en áreas del genoma denominadas microsatélites, que son secuencias repetitivas de 2 a 5 pares de bases que se repiten en valores de menos de 50 veces⁹⁵. La variabilidad natural de estas repeticiones hace que sean útiles para la filiación de muestras individuales o estudios genéticos de parentesco⁹⁵.

En el contexto neoplásico, y en concreto en el CCR, las neoplasias con MSI suelen ser pobremente diferenciadas y de morfología mucinosa o medular⁹⁶. Asimismo, se presentan en dos contextos clínicos y genéticos diferenciados. El primero es debido a mutaciones germinales en los genes reparadores del ADN (*mismatch repair* -MMR-)⁹⁷, lo cual da lugar al síndrome de Lynch. En este contexto, que afecta el 5% de CCR⁹⁸, el paciente presenta una mutación en línea germinal de un gen MMR (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* o *EPCAM*)⁹⁷. La inactivación somática del otro alelo conlleva a la MSI y al desarrollo de neoplasias colorrectales o de otros órganos, entre los que destacan endometrio, ovario, estómago, intestino delgado, páncreas, tracto hepatobiliar, tracto uroepitelial superior, cerebro (variante Turcot) y piel (variante Muir-Torre)⁹⁸. Por otro lado, el fenómeno de MSI puede

producirse mediante cambios epigenéticos. Estas pueden ocurrir hasta en un 15% de CCR esporádicos, y es debido a hipermetilación del promotor del gen *MLH1*, lo que comporta su silenciación⁹⁹. Más del 70% de estos casos ocurren en contexto de la mutación *BRAF*^{V600E} y un fenotipo metilador⁹⁹.

Debido a que la prevalencia del síndrome de Lynch es baja, se han desarrollado diferentes estrategias de detección de estos casos, con el objetivo de obtener la mayor eficiencia posible⁹⁷. El más extendido en el ámbito de la evaluación histopatológica es la evaluación inmunohistoquímica de los genes MMR⁹⁶, que se recomienda realizar en poblaciones de riesgo como pacientes con CCR menores de 50 años, o pacientes con una marcada historia familiar de neoplasias asociadas al espectro Lynch, o variantes histológicas mucinosas o medulares⁹⁹. De todos modos, otros trabajos apuestan por un cribado universal de MMR, ya que aumentan la sensibilidad de detectar pacientes con síndrome de Lynch con modesto aumento del costo diagnóstico¹⁰⁰. En la evaluación inmunohistoquímica, la pérdida de uno o varios marcadores orienta hacia las potenciales mutaciones germinales en el gen correspondiente, o indica la necesidad de descartar alteraciones somáticas asociadas a tumores esporádicos, como la mutación *BRAF*^{V600E}, en pacientes con pérdida de expresión de *MLH1*⁹⁶⁻⁹⁹.

De manera paralela, se puede evaluar directamente la presencia de inestabilidad de microsatélites, mediante el análisis de cinco loci seleccionados: BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 y Mono-27⁹⁹. A pesar de que en un principio se apostó por marcadores de di- o trinucleótidos, debido a que estos presentan menores tasas de sensibilidad y especificidad, la mayoría de paneles actuales se basan en marcadores de mononucleótidos^{99,101}. Un fenotipo de MSI alto se define por la presencia de al menos dos marcadores inestables entre los 5 analizados o $\geq 30\%$ de los marcadores inestables si se utiliza un panel más extenso¹⁰².

Por otra parte, las mutaciones en los genes *RAS*, tanto *K-RAS* como *N-RAS*, se han asociado con falta de respuesta terapéutica a fármacos biológicos anti-EGFR^{103,104}. Aunque las evidencias principales se centran en la evaluación de los codones 12, 13 y 61 del gen *K-RAS*, estudios actuales parecen indicar que se deben estudiar al menos los codones 12, 13, 61 y 146 de ambos *K-RAS* y *N-RAS*^{99,105,106}. Por otro lado, en la actualidad no hay suficiente evidencia de la utilidad clínica de la evaluación de *PIK3CA* y *PTEN*⁹⁹.

Las plataformas de evaluación masiva de datos, como la secuenciación de nueva generación o los arrays de expresión génica, han permitido el análisis a gran escala de potenciales marcadores neoplásicos en los últimos años. En el contexto del CCR, un reciente trabajo siguiendo esta metodología ha permitido recientemente identificar el marcador CDX-2 como predictor de mal pronóstico¹⁰⁷. Probablemente, más marcadores serán añadidos en un futuro mediante unas u otras plataformas.

4.2. Estadio ganglionar

4.2.1. *Estatus actual*

En la estadificación del CCR el estatus de los GLs regionales es uno de los factores más importantes. Las guías actuales de estadificación están basadas en el estudio histológico de los GLs mediante hematoxilina-eosina (HE)^{1,3,15}. Asimismo, se recomienda la resección quirúrgica sin terapia adyuvante para pacientes con CCR en estadio I y II, a excepción de un subgrupo de alto riesgo dentro del estadio II^{74-77,79}. Aunque en la mayoría de los casos la estadificación ganglionar mediante evaluación histológica es apropiada, hay pruebas sustanciales de que está lejos de ser exacta¹⁰⁸⁻¹¹⁰. Cada GL se evalúa histológicamente con HE mediante secciones de 2-5 micrómetros de grosor. Esta muestra es limitada y representa menos del 0,5% del volumen total del GL, lo que puede conducir a falsos negativos^{108,109}. De hecho, hasta el 25% de los pacientes con GLs negativos evaluados mediante HE y una resección quirúrgica potencialmente curativa sufren una recidiva de la

enfermedad, por lo que se postula que algunos de estos pacientes pueden tener metástasis ganglionares no detectadas inicialmente^{108,111,112}. En este contexto, se ha realizado un gran esfuerzo en los últimos años para intentar realizar una estadificación ganglionar más precisa y por lo tanto un mejor diagnóstico, utilizando para ello técnicas más sensibles basadas principalmente en técnicas inmunohistoquímicas y moleculares^{108,109,111,112}.

4.2.2. Técnicas inmunohistoquímicas

Con el objetivo de detectar células tumorales no identificadas mediante evaluación rutinaria por HE, múltiples estudios han evaluado la utilidad de las técnicas inmunohistoquímicas. Debido a que las series de estos casos eran limitadas y presentaban distintos enfoques, estos han sido recogidos y evaluados en varios metaanálisis recientes, indicando su utilidad potencial para predecir consecuencias clínicas tales como el tiempo libre de enfermedad o la supervivencia global^{108,111}. Estos metaanálisis mostraron asimismo que la mayoría de estudios realizados hasta el momento se han basado en el uso de citoqueratinas (tales como citoqueratinas AE1/AE3, Cam5.2 o citoqueratinas 5, 6, 8, 17, 18 y 20) u otros marcadores epiteliales como EPCAM (detectado mediante BerEp4)¹¹¹.

4.2.3. Técnicas moleculares

4.2.3.1. Concepto

Las técnicas moleculares permiten, gracias a su metodología, el análisis exhaustivo de la totalidad de cada GL^{108,109,111-119}. En la literatura se encuentran recogidos múltiples estudios; estos se han basado principalmente en la realización de PCRs en tiempo real con transcripción inversa (RT-PCR), con múltiples dianas moleculares: mutaciones de codón 12 de *K-RAS*, *GUCY2C*, *c-MET*, *MAGE-A3*, *GalNAc-T*, predominando los estudios de *CEA* y citoqueratina 20^{109,120-128}, así como de ARN mensajero (ARNm) de citoqueratina 19¹¹³⁻¹¹⁹.

La mayor sensibilidad de los estudios moleculares se ha demostrado con la presencia de carga tumoral no detectada u “oculta”, que puede llegar a ser de hasta un 25-50% en GLs

de pacientes con CCR, inicialmente evaluados como negativos mediante HE^{108,109,111,112,116,129}. Aunque el valor pronóstico de la detección molecular de tumor en los ganglios de CCR en estadios I-II es controvertida¹³⁰, hay suficientes datos que indican que se asocia con un mayor riesgo de recidiva de la enfermedad y peor supervivencia^{108,111,112}. Aun así, la mayoría de los métodos moleculares desarrollados para la estadificación molecular de los GLs en CCR han sido, hasta la actualidad, demasiado complejos y requerían excesivos recursos técnicos, económicos y de personal¹⁰⁹.

4.2.3.2. Dianas moleculares y técnicas

4.2.3.2.1. ARNm de Citoqueratina 19

4.2.3.2.1.1. Concepto

La técnica molecular *One Step Nucleic Acid Amplification* (OSNA; Sysmex Corporation, Kobe, Japón) utiliza el método RT-LAMP (*Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification*), una RT-PCR modificada para amplificar el ARNm de citoqueratina 19 (*CK19*) a partir de lisados de cualquier tejido, incluyendo GLs¹³¹.

4.2.3.2.1.2. Técnica OSNA

La técnica molecular OSNA es un método cuantitativo, altamente sensible y específico que se ha desarrollado para automatizar el proceso y proporcionar resultados cuantitativos de la expresión de ARNm de *CK19* en 40-45 minutos para 4 GLs. El ARNm de *CK19* fue seleccionado entre otros marcadores (ARNm de *CK19*, *FOXA1*, *SPDEF*, *CEA*, *MGB1*, *TACSTD2*, y *MUC1* en un estudio, y ARNm de *CEA*, *CK19*, *FXYD3*, *CK20*, *MUC13*, *CFTR*, *MUC11*, *MUC12* y *MUC2* en otro) por haber mostrado la mayor reproductibilidad y rendimiento diagnóstico, con valores de sensibilidad del 94.9-95.2% y de especificidad del 97,7 al 97,9%^{118,131}. La técnica analiza completamente los GLs y la cantidad de ARNm de *CK19* detectada, valorada en número de copias/ μ L, se correlaciona con el tamaño de los focos metastásicos: se corresponde con células tumorales aisladas cuando se obtienen menos de 250 copias/ μ L, micrometástasis en el intervalo entre 250 y 5.000 copias/ μ L, y

macrometástasis al obtener más de 5.000 copias/ μL ^{114,131-134}. El sistema ha sido validado para la evaluación de GLs de cáncer de mama y de colon, proporcionando resultados comparables a un análisis histológico e inmunohistoquímico exhaustivo de los mismos^{113-117,129,131-133,135}.

4.2.3.2.1.3. Procedimiento

En la técnica OSNA, los GLs recogidos en fresco son evaluados mediante la plataforma RD-100i, siguiendo protocolos ya establecidos previamente en la literatura¹³¹. El rango de peso del GI que el analizador permite está entre 40 y 600 mg. Por tanto, los GLs de más de 600 mg se deben seccionar y se procesan por separado, sumándose el resultado en las distintas determinaciones que los conforman. Por otra parte, los GLs que no alcancen el peso mínimo necesario no pueden ser evaluados molecularmente y se deben procesar únicamente por técnicas histológicas convencionales.

Cada GL se mezcla en un tubo de fondo cónico individualmente con 4 ml del buffer de homogeneización Lynorhag, pH 3.5, que estabiliza las moléculas de ARNm y protege contra la actividad de la ribonucleasa, minimiza el efecto de sustancias inhibitoras que pudieran estar presentes y precipita el ADN genómico. Los GLs se homogeneizan con un equipo Polytron durante 90 segundos. De la muestra resultante se pipetea 1 ml en un tubo Eppendorf, que se centrifuga a 10.000 *g* y a temperatura ambiente durante 1 minuto. De la fase intermedia del mismo se pipetea 20 μL en un tubo Eppendorf (muestra principal) y otros 20 μL en un segundo tubo, que contendrá 180 μL de Lynorhag (muestra diluida). Ambas se introducen en el RD-100i, que en el tubo de reacción final mezcla 2 μL de muestra (concentrada o diluida), 3 μL de solución enzimática y 20 μL de solución del “primer” y después realiza la amplificación de manera isotérmica a 65°C, con la detección de ARNm de *CK19* de manera totalmente automática en un tiempo de 16 min, utilizando el reactivo Lynoamp. Se pueden analizar hasta 4 muestras simultáneamente. De la muestra homogeneizada en el tubo de fondo cónico se pipetea 1 ml adicional en un tubo Eppendorf (muestra de

backup). Este tubo se congela a -80°C y serviría para reanalizar la muestra en caso necesario.

La detección se lleva a cabo mediante la medición en tiempo real de la turbidez de la reacción. El pirofosfato, que se produce en el curso de la reacción de RT-LAMP, se une a un ion de magnesio para dar lugar a pirofosfato de magnesio. La cantidad de pirofosfato de magnesio aumenta con el paso de la reacción. Debido a que el pirofosfato de magnesio tiene una baja solubilidad en la solución acuosa precipita cuando su concentración alcanza la saturación, y esta causa la turbidez que es evaluada por la plataforma RD-100i en intervalos de cada 6 segundos¹³⁶.

4.2.3.2.1.4. Concepto de Carga Tumoral Total

La técnica OSNA otorga un valor cuantitativo en copias de ARNm de *CK19* por μL de la cantidad o carga neoplásica de cada GL. Gracias a ello, es posible sumar todas las copias de ARNm de *CK19* de cada GL positivo en un determinado paciente. Dicho sumatorio, que representa la cantidad o carga neoplásica total en GLs, se define como carga tumoral total o CTT^{129,133}.

4.2.3.2.1.5. Estado actual en cáncer de colon

La técnica OSNA se ha basado en la evaluación de ARNm de *CK19* debido a que este marcador ha obtenido mejores resultados que otros marcadores potenciales^{118,131}. En este contexto, es interesante recalcar que mientras que Tsujimoto et al centraron sus esfuerzos en la validación de la plataforma para la evaluación en cáncer de mama¹³¹, Yamamoto et al hizo una evaluación análoga en el contexto de cáncer de colon¹¹⁸. Ellos evaluaron los niveles de ARNm de hasta 98 marcadores seleccionados en ganglios con y sin metástasis de carcinomas de colon; de entre ellos seleccionaron los genes de *CK19*, *CEA* y *CK20*, y de entre los mismo fue el ARNm de *CK19* el que mostró los niveles más altos de sensibilidad y especificidad¹¹⁸.

Menos de una decena de publicaciones hasta la actualidad han estudiado el potencial de la evaluación del ARNm de *CK19* en GLs de cáncer de colon^{113-117,129}. Estos estudios pueden ser divididos en dos grupos principales. Los primeros, publicados entre los años 2010 y 2012, se basaron en comparar el resultado de la evaluación mediante OSNA de GLs de carcinomas de colon o lesiones benignas con la evaluación histológica exhaustiva con secciones seriadas y estudios inmunohistoquímicos^{113,114,117}. Estos estudios demostraron que la técnica OSNA presentaba unos niveles extremadamente altos de sensibilidad y especificidad, con índices de concordancia de aproximadamente el 97%^{113,114,117}.

Los siguientes trabajos se han basado principalmente en estudios multicéntricos enfocados a evaluar el potencial de la técnica OSNA para detectar restos neoplásicos en GLs de carcinomas de colon y colorrectales sin evidencia histológica de neoplasia, es decir, estadificados como pN0¹¹⁶, así como su potencial para modificar la estadificación ganglionar¹²⁹. En ambos estudios, la tasa de positividad OSNA en pacientes pN0 fue variable, de entre el 11,3% y el 25,2%^{116,129}. Asimismo, los estudios mostraron una correlación de la positividad OSNA con factores histológicos relevantes, tales como el número de GLs aislados por espécimen, el estadio pT tumoral o la presencia de invasión linfática^{116,129}.

Cabe recalcar que en el estudio de Yamamoto et al se correlacionó la CTT con el estadio histológico ganglionar, aumentando de manera significativa a medida que aumentaba el estadio ganglionar ($p=1.34 \times 10^{-7}$): los valores de CTT para los estadios pN0, pN1 (1 a 3 GLs positivos) y pN2 (4 o más GLs positivos) fueron respectivamente 1.550 copias de ARNm de *CK19*/μL (300-320.000 copias/μL), 24.050 copias/μL (250-890.000 copias/μL), y 90,600 copias/μL (7.700-1.635.100 copias/μL)¹²⁹.

4.2.3.2.1.6. Modelo en cáncer de mama

La técnica OSNA se comenzó a utilizar en el contexto del manejo intraoperatorio del cáncer de mama, en la evaluación del GLC^{131,132,135,137-140}. Estos primeros estudios se basaron en evaluar la capacidad del método OSNA en detectar patología neoplásica en GLC axilares en cáncer de mama, mediante la comparativa entre esta técnica y estudios histológicos e inmunohistoquímicos exhaustivos, obteniendo concordancias superiores al 90%^{131,132,135,137-139}.

Los siguientes estudios se han centrado en evaluar el potencial de la técnica OSNA realizada en GLC axilares de cáncer de mama para predecir la presencia de metástasis axilares adicionales en ganglios no centinela^{133,140-143}. En estos estudios se ha recalado la utilidad de la capacidad de cuantificar que ofrece la técnica OSNA. Las tasas de afectación de GLC no axilares dependen del resultado OSNA: si este identificaba la presencia de micrometástasis en GLC el riesgo de metástasis en ganglios no centinela rondaba el 10-20%, pero si se detectaban macrometástasis el riesgo aumentaba hasta el 35-55%^{139,141,142,144,145}.

Otros grupos han procurado avanzar más, y han centrado sus esfuerzos en evaluar el poder predictivo de la CTT en GLC^{133,140,143}. Han observado que la CTT de los GLC es capaz de determinar la probabilidad de metástasis axilares adicionales, con un punto de corte estimado de 15.000 copias de ARNm de *CK19*/μL por caso en uno de los estudios¹³³. Análisis adicionales por el mismo grupo han revelado la complejidad de la realidad, ya que el valor predictivo potencial de la técnica OSNA y la CTT puede verse modulada por los otros factores histológicos y clínicos observables. En otro estudio revelaron que CTT de más de 1.2×10^5 copias/μL en GLC axilares de cáncer de mama presentaban un valor predictivo negativo del 80% de presentar metástasis axilares adicionales, pero que si evaluaba el subgrupo con receptores hormonales positivos, se obtenía un valor predictivo

negativo de 83,7% con 5×10^5 copias/ μL ¹⁴³. Estos hallazgos indican que la CTT tiene un impacto pronóstico variable dependiendo de otros factores clínicos e histológicos. Avanzando en sus evaluaciones han presentado un nomograma que intenta predecir el riesgo de metástasis ganglionares adicionales¹⁴⁰. En el mismo han incluido no solo el valor de la CTT sino también otros factores que les resultaron estadísticamente significativos para predecir la presencia de metástasis ganglionares axilares adicionales: la presencia de invasión linfovascular, el número de GLC afectos, el estado de Her2 y el tamaño tumoral¹⁴⁰.

4.2.3.2.2. Otras técnicas

Además del ARNm de la *CK19*, diferentes marcadores moleculares han sido postulados como alternativos a la estadificación patológica tradicional. Uno de ellos, por ejemplo, se trata de la Guanilil ciclasa C (*GUCY2C*), un receptor que está habitualmente restringido a las células epiteliales intestinales, y se encuentra sobreexpresado universalmente en células neoplásicas colorrectales¹⁰⁹. Su evaluación en GLs mediante RT-PCR ha mostrado que puede ser relevante como factor predictivo tanto en resultado dicotómicos (si/no) como en resultados estratificados de volumen neoplásico en evaluaciones cuantitativas¹⁰⁹. Otro estudio muy reciente se basó también en el uso de RT-PCR cuantitativa para evaluar la cantidad de ARNm de *CEA* en ganglios linfáticos de carcinomas de colon en estadio II. Estos observaron que un volumen de micrometástasis mayor se correlacionaba con una peor supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global a los 5 años¹⁴⁶. Por lo tanto, es creciente la evidencia de que la cuantificación molecular ganglionar en cáncer de colon puede tener una marcada relevancia clínica, si bien puede ser imposible de realizar si se basa en técnicas complejas y costosas como la realización de RT-PCRs cuantitativas.

4.2.3.2.3. Concepto de ganglio centinela en cáncer de colon

El ganglio centinela se define como el ganglio (o grupo ganglionar) que primero recibe drenaje de una neoplasia. Su evaluación comenzó en cáncer de pene¹⁴⁷ y se fue extendiendo a otras neoplasias y localizaciones^{148,149}, siendo muy útil en el melanoma¹⁵⁰. En la mayoría de ellas el objetivo de identificar el GLC es someterlo a un estudio histológico y/o molecular exhaustivo, con el fin de determinar si presenta células neoplásicas en su seno^{133,143,148-150}. En el caso de que no, y al tratarse del primer nivel de drenaje de la neoplasia, se acepta que el resto de localizaciones ganglionares no están afectadas, evitando la morbilidad que podría conllevar su exéresis adicional. Además, al disminuir el número de ganglios a evaluar, esto permite la realización de técnicas de ultraestadificación^{133,143,148-150}.

En el CCR, en cambio, la técnica del GLC tiene otras implicaciones. Debido a que por la propia técnica quirúrgica los GLs regionales son extraídos junto con el tumor primario (tanto los GLC como los no centinela), el potencial de evitar linfadenectomías adicionales en caso de que el GLC sea negativo no existe^{151,152}. Su utilidad, por lo tanto, se centra en seleccionar un reducido número de GLs, donde sería factible realizar técnicas de ultraestadificación en la práctica clínica diaria^{151,152}.

Una revisión sistemática sobre el procedimiento del GLC en cáncer de colon realizada por van der Zaag muestra que hasta en el 90% de los casos puede ser identificado el GLC en un espécimen de cáncer colorrectal¹⁵². La mayoría de los estudios realizados se han basado en secciones seriadas evaluadas mediante HE, junto con la ayuda de tinciones inmunohistoquímicas, mientras que en menor medida se ha recurrido a técnicas moleculares como la RT-PCR¹⁵². Con ellas se ha obtenido una sensibilidad del 69,6% para detectar metástasis ganglionares adicionales, valor que aumenta hasta el 80,2% en caso de incluir las evaluaciones inmunohistoquímicas, con tasas de sobreestadificación de entre el

7,7% al 18,9% dependiendo de si se considera como positiva la detección de células tumorales aisladas¹⁵².

En este contexto cabe recalcar el trabajo de Vogelaar et al, que utilizó la técnica OSNA para evaluar el GLC en carcinoma de colon¹¹⁵. En ella se evaluaron 325 GLC de 128 pacientes. Mientras que la evaluación mediante OSNA de los GLC conllevó una sobreestadificación del 19% de casos inicialmente estadificados como pN0, este valor aumentaba hasta el 46,4% si se combinaba con estudios morfológicos e inmunohistoquímicos exhaustivos de los restos de GLC no incluidos en la evaluación molecular¹¹⁵. Por lo tanto, y al igual que en cáncer de mama, la evaluación del GLC mediante la técnica OSNA en cáncer de colon es un procedimiento factible que puede aportar información adicional.

