



UNIVERSITAT<sub>DE</sub>  
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.**

# DISCUSIÓN GENERAL

---



El manejo del CCR es actualmente un área de gran impacto asistencial dentro del ámbito sanitario. Esto se debe en parte a la gran prevalencia e incidencia del mismo<sup>4,154</sup>, siendo una de las principales neoplasias en ambos sexos, y al creciente abanico diagnóstico y terapéutico. El CCR es, junto al carcinoma de mama y de cérvix, una de las principales dianas de los programas de cribado poblacional<sup>5,155</sup>. Estos programas han permitido modificar el espectro clínico del CCR, debido a la mayor identificación de estadios precoces y lesiones precursoras<sup>5,156,157</sup>. En este contexto, el manejo terapéutico del CCR también ha cambiado conceptualmente. Anteriormente, los carcinomas localmente avanzados y las metástasis eran el mayor reto diagnóstico y terapéutico, pero el aumento de lesiones en estadios precoces deriva en el intento de obtener remisiones o curaciones completas, adquiriendo vital importancia la minimización del impacto del tratamiento adyuvante.

El estudio y estadificación histológica del CCR no ha variado desde su concepción<sup>9</sup>, debido en gran parte a haber demostrado ser una herramienta eficiente<sup>158</sup>. Aún así, y teniendo en cuenta los avances actuales en otros ámbitos, sus deficiencias como predictor de recidiva y pronóstico se han visto remarcadas<sup>79,153,159,160</sup>. Estas deficiencias son reseñables en los casos del CCR sin evidencia de metástasis ganglionares por estudio histológico convencional, englobados en los estadios I y II. La actitud terapéutica en estos casos se basa principalmente en resecciones quirúrgicas con intención curativa<sup>61,62</sup>. Algunos de estos casos reciben de manera adicional tratamiento adyuvante, principalmente en forma de esquemas quimioterápicos basados en 5-fluorouracil, capecitabina, oxaliplatino, e irinotecan<sup>61,62,154</sup>. En este contexto, los pacientes con riesgo de recidiva son clínica y patológicamente difíciles de identificar<sup>161,162</sup>. Además, la extensión de la neoplasia a los GLs puede ocurrir en etapas tempranas del desarrollo<sup>163,164</sup>, lo que implica un potencial impacto pronóstico negativo<sup>108,109,112,165</sup>. Por lo tanto, la evaluación de la estadificación ganglionar surge como un factor clave para el manejo terapéutico del CCR<sup>108,111,112</sup>.

La técnica OSNA ya sido utilizada previamente en cáncer de colon, con porcentajes variables de positividad en pacientes pN0<sup>115,116,118</sup>. En nuestro primer estudio, hemos detectado un porcentaje de casos positivos mayor que cualquiera de estos estudios, hasta un 51% de casos<sup>166</sup>. Las causas de esta diferencia pueden ser variadas, aunque es posible que se centren en la propia búsqueda de los GLs. Hemos analizado un gran número de GLs por caso, llegando a obtener una mediana de 15 GLs por paciente, 12 de ellos aislados en fresco y remitidos a estudio OSNA<sup>166</sup>. Esto nos ha permitido aproximarnos a las directrices internacionales –ya comentadas–, que recomiendan la recogida de al menos 12 ganglios por caso<sup>3,9,15,167</sup>. En otros estudios estas medianas han sido variables, de entre 8-14 GLs por caso<sup>113,115,116,129</sup>, pero en algunos estudios los GLs analizados por OSNA han representado solo el 44,5% de todos los GLs obtenidos<sup>129</sup>, cifra que ha sido del 78% en nuestro estudio<sup>166</sup>. Estos datos ponen de relieve la ya remarcada importancia de la búsqueda exhaustiva de GLs, ya que la exactitud de la estadificación molecular depende del número de ganglios obtenidos<sup>36,160,167-170</sup>.

El análisis multivariante de este primer estudio ha mostrado que el número de GLs, el sexo y grado histológico fueron predictores independientes del resultado OSNA<sup>166</sup>. Las positivities moleculares ganglionares se correlacionaron en los estudios univariantes con factores de alto riesgo clásicos, tales como la histología mucinosa o anillo de sello, la presencia de focos de alto grado histológico, el tamaño del tumor y el sexo masculino. La importancia pronóstica de la detección de metástasis ganglionares mediante técnicas moleculares ya ha sido manifestada en cáncer de mama y CCR<sup>108,109,112,119,133,143,171</sup>. Varios estudios y metaanálisis han encontrado una asociación significativa independiente entre la detección molecular de neoplasia en GLs y un aumento del riesgo de recidiva de la enfermedad y la mala supervivencia en pacientes con CCR<sup>108,109,111,112,165,171</sup>. Sin embargo, la carga tumoral detectada mediante técnicas moleculares puede no ser siempre clínicamente relevante. Es plausible que la sola presencia de pequeñas cantidades de células tumorales en GLs regionales indique un riesgo aún no definido de recidiva de la enfermedad, sin implicar necesariamente un mal pronóstico<sup>109,133,172</sup>.

Un estudio que utiliza la detección en GLs con RT-qPCR de la GUCY2C encontró positividad en el 87,5% de los pacientes con cáncer de colon, aunque sólo el 20,9% de ellos desarrolló la enfermedad recurrente<sup>109</sup>. Del mismo modo, hemos encontrado en nuestro segundo estudio pequeñas cantidades de ARNm de CK19 en 3 de 8 pT0 y 10 de los 17 pTis<sup>173</sup>. En ese sentido, otras técnicas moleculares altamente sensibles, tales como la biopsia líquida, también han demostrado la presencia de ADN circulante tumoral en pacientes con lesiones precursoras y en carcinomas *in situ*<sup>174,175</sup>.

Por ello, la cuantificación de la cantidad de la carga tumoral en los GLs regionales surge como una evaluación obligatoria con el fin de ser capaz de determinar el significado pronóstico de los resultados moleculares, tal y como se ha indicado en CCR<sup>108,109,112,119,171</sup> y cáncer de mama<sup>133,143</sup>. Algunos autores también han demostrado la relación entre la cantidad de tumor metastásico y el pronóstico, haciendo hincapié en la importancia de distinguir ITC de micrometástasis<sup>109,112,115,116,176</sup>. Dos estudios multicéntricos japoneses han remarcado recientemente la necesidad de estratificar los resultados moleculares en la evaluación de GLs. El primero de ellos ha demostrado que la CTT evaluada mediante OSNA aumenta significativamente al aumentar el estadio pN<sup>129</sup> y sugiere que el OSNA puede ser una técnica potencialmente útil en la estadificación ganglionar. El segundo estudio ha demostrado la correlación del volumen de micrometástasis ganglionares evaluadas mediante RT-qPCR para ARNm de *CEA* como predictor de recidiva en pacientes en estadio II<sup>146</sup>.

En este contexto, en el cáncer de mama se han llegado a definir puntos de corte de hasta 15.000 copias de ARNm de *CK19*/μL para determinar la probabilidad de metástasis axilares adicionales<sup>133</sup>. En nuestros estudios las CTT obtenidas han sido mucho menores; en el segundo estudio la mediana observada ha sido de 1.350 copias/μL por paciente, evaluando pacientes con lesiones precursoras y de estadio I<sup>173</sup>, mientras que fue de 2.015 copias/μL en el primero, con pacientes en estadios I y II<sup>166</sup>. Por el contrario, un paciente evaluado como pN0

en HE que presentó recidiva de la enfermedad tenía una CTT de 47.760 copias/ $\mu$ L, y dos pacientes con metástasis ganglionares en HE tenían títulos de 560.000 y 41.160 copias/ $\mu$ L, respectivamente<sup>173</sup>. Asimismo, tras un periodo de seguimiento mínimo de dos años de la cohorte del primer estudio, cuatro casos OSNA positivos que recurrieron tenían una CTT mediana de 4.375 copias/ $\mu$ L<sup>166</sup>.

Es destacable la tendencia, no significativa, observada entre la CTT y el estadio pT en este primer estudio<sup>166</sup>. Mientras que la CTT fue de 1.280 copias/ $\mu$ L en los pacientes en estadio pT1, esta aumentaba a 1.790 copias/ $\mu$ L en los pT2, y el estadio pT3 obtuvo la tasa más alta de detección de ARNm de *CK19* (37/66) y CTT (3.080 copias/ $\mu$ L)<sup>166</sup>. Curiosamente, la mediana de CTT en los casos pT4a fue solo de 540 copias/ $\mu$ L. Esto podría deberse a que se incluyeron tumores pT4 de localización antimesenterica en lugar de los tumores voluminosos con marcada infiltración de tejido adiposo, a la escasa cantidad de casos OSNA positivo (5 entre los tumores pT4a), y por el hecho de que en 3 de ellos menos del 65% de GLs fueron analizados por OSNA.

Estas distribuciones son más interesantes al observarse un comportamiento diferente entre los tumores de bajo y de alto grado, con una asociación significativa en los tumores de bajo grado entre CTT y el estadio pT y el tamaño del tumor ( $\rho = 0,27$ )<sup>166</sup>. Este fenómeno puede explicarse por el hecho de que los tumores de bajo grado tienden a seguir una secuencia ordenada de acumulación de alteraciones moleculares a medida que crecen y adquieren propiedades infiltrativas, mientras que son diferentes las vías moleculares implicadas en tumores de alto grado y su comportamiento agresivo desde el principio<sup>177</sup>. Reforzando la importancia del grado tumoral en la diseminación neoplásica ganglionar, el tamaño tumoral no se correlacionó con la positividad OSNA cuando se estratificó por grado o tipo histológico.

Para garantizar una evaluación adecuada y una estadificación fiable se recomienda el análisis de al menos 12 GLs por pieza quirúrgica<sup>15,167</sup>. Se ha demostrado que el número de GLs

evaluados se correlaciona con la supervivencia: a mayor número de GLs examinados, mayor es la posibilidad de detectar metástasis<sup>37,178,179</sup>. El número de GLs identificados depende de varios factores, clínicos, quirúrgicos y patológicos. Este último, que incluye técnicas que facilitan la identificación de los GLs, son los críticos<sup>37,178,180</sup>.

El tatuaje endoscópico se introdujo originalmente como un método de ayuda para endoscopistas y cirujanos para localizar lesiones colónicas difíciles de identificar<sup>19,20,181,182</sup>. Aunque clínicamente ha mostrado gran utilidad, su impacto en cuanto a su beneficio en la búsqueda de GLs y la estadificación del CCR es controvertido<sup>36-42</sup>. Mientras algunos estudios muestran que el tatuaje preoperatorio mejora la búsqueda de GLs<sup>37-39,42</sup> estudios con hallazgos divergentes han sido recientemente publicados<sup>40</sup>.

De acuerdo con los estudios previos<sup>36-39,41,42</sup>, hemos evaluado la utilidad del tatuaje colonoscópico preoperatorio con el fin de conseguir mayores tasas de GLs. Hemos obtenido una mediana de 17 GLs en colectomías tatuadas frente a 14,5 GLs en casos no tatuados ( $p=0,019$ )<sup>173</sup>. En consecuencia, encontramos que el 87,3% de los casos tatuados tenía al menos 12 GLs, lo que representó un incremento de 20.6% con respecto a la casos no tatuados<sup>173</sup>. Cabe recalcar que este aumento se produjo principalmente en la búsqueda de GLs en fresco ( $p=0,02$ ), lo que permitió que más GLs fueran remitidos a estudio molecular<sup>173</sup>.

En este segundo estudio hemos tratado de evaluar el beneficio práctico de un espécimen tatuado<sup>173</sup>. Al igual de Bartels hizo en su estudio, hemos considerado como tatuados los casos sólo cuando presentaban evidencia histológica (macro- o microscópica) de tinta china<sup>38</sup>. Diferencias en la metodología y limitaciones en estudios previos han podido influir en los hallazgos discordantes reportados. Feo et al analizaron retrospectivamente 250 casos de CCR dividiéndolos en dos cohortes según había presentado tatuaje colonoscópico preoperatorio o no<sup>40</sup>. Concluyeron que el tatuaje preoperatorio no mejoraba las tasas de GLs encontradas. De todos modos, sólo realizaron evaluación histológica en busca de depósitos de carbón en 30 de

los 107 casos de su estudio. De entre ellos sólo encontraron trazas de partículas de carbón en 2 de 30 casos. En contraste, de los 47 casos tatuados de nuestra cohorte prospectiva, todos presentaban trazas macroscópicas e histológicas de partículas de carbón<sup>173</sup>.

El tatuaje colonoscópico no requiere de procesos pre- o intraoperatorios adicionales, ya que los depósitos de partículas de carbón permanecen en los GLs. De hecho, en nuestro estudio el período medio entre el tatuaje endoscópico y resección quirúrgica fue de 63 días (RIC, 38-92 días)<sup>173</sup>. Además es beneficioso en la difícil identificación de GLs de menos de 5 mm de diámetro, ya que las metástasis ganglionares, especialmente en carcinomas de colon precoces, a menudo están presentes en GLs de pequeño tamaño<sup>15,113,116</sup>. Cabe recalcar que el tamaño ganglionar no es un buen indicador preoperatorio de la estadificación ganglionar, ni un predictor de la presencia de tumor; algunos estudios no han observado relación entre el tamaño ganglionar y la probabilidad de metástasis<sup>169,183,184</sup>. Aunque en nuestro primer estudio hemos identificado una asociación significativa entre la positividad de ARNm de *CK19* y un mayor tamaño de los GLs, encontramos presencia de ARNm de *CK19* en el 15,6% de los GL de igual o menos de 0,07g<sup>166</sup>.

El tatuaje endoscópico también puede aumentar la probabilidad de identificar el primer estadio de drenaje ganglionar, los GLs con la mayor probabilidad de albergar enfermedad metastásica<sup>36-38,41</sup>. Spatz et al analizó 311 GL de 21 casos, con la conclusión de que el tatuaje colonoscópico es potencialmente beneficioso para una adecuada estadificación del cáncer de colon<sup>41</sup>.

Por ello, hemos evaluado el efecto del tatuaje endoscópico junto con el método OSNA<sup>173</sup>. Hemos encontrado presencia de ARNm de *CK19* en GLs de 59% de piezas quirúrgicas. Remarcablemente, el ARNm de *CK19* no tuvo una distribución aleatoria en el lecho ganglionar, ya que la positividad molecular fue significativamente mayor entre los GLs tatuados ( $p < 0,001$ )<sup>173</sup>. De hecho, la odds ratio de encontrar ARNm de *CK19* entre los GL

tatuados comparado con los no tatuados fue de 3,1<sup>173</sup>. En este contexto se habría podido discernir en cuanto al resultado molecular de manera correcta más del 91% de los casos analizado únicamente los GLs tatuados. Esto podría ser explicado por el hecho de que en algunos casos la zona tatuada pudiera no haber correspondido completamente con el área de drenaje ganglionar tumoral, no habiendo tintado varios de los GLs.

Este estudio ofrece los resultados de la combinación de dos métodos de alta sensibilidad del análisis de GLs: no solo demuestra que el tatuaje conlleva un gran rendimiento de identificación de GLs, sino que también muestra que la carga tumoral está sobre todo presente en los GLs tatuados<sup>173</sup>. Por lo tanto, el tatuaje endoscópico parece no solo beneficiar la identificación de la ubicación quirúrgica o endoscópica del tumor, sino que también beneficia el manejo clínico ya que proporciona un diagnóstico más preciso del estatus ganglionar.

Se están desarrollando en la actualidad distintos proyectos tanto nacionales como internacionales para dilucidar el papel clínico del método OSNA en el cáncer de colon. Éstos están basados principalmente en demostrar la relevancia clínica de los datos obtenidos. Para ello, se deben llevar a cabo estudios comparativos con el estudio histológico clásico, teniendo como objetivo el impacto clínico y su capacidad para predecirlo. Asimismo, esto implicará la evaluación de los distintos datos que ofrece la técnica, desde valores nominales (número de ganglios positivos) hasta variables continuas como la carga tumoral total.

Una vez identificada la capacidad predictora de los resultados del método OSNA, esta deberá ser correlacionada con otras variables de riesgo clínico, clásicas o de reciente definición. Los trabajos de esta tesis ya muestran la correlación de algunas de esas variables con los resultados moleculares. Esto debería conducir al desarrollo de algoritmos y nomogramas valorando el peso de todas las variables en cada escenario. Estos modelos predictivos deberán ser validados con sus respectivas correlaciones clínicas.

Asimismo, el método OSNA debe demostrar su factibilidad en contexto del manejo de laboratorio de especímenes de cáncer de colon. Por el momento, los trabajos presentados en esta tesis han demostrado que la recolección de GLs en fresco es asistencialmente factible en múltiples laboratorios de Anatomía Patológica de este país. Aún más, la necesidad de realizar la búsqueda de GLs en fresco no ha dificultado el hecho de obtener las medianas de GLs por caso recomendadas por las guías internacionales de manejo clínico<sup>3,9,15,167</sup>. Adicionalmente, hemos recalado que procedimientos como el tatuaje endoscópico benefician adicionalmente de manera patente esta recolección.

Dependiendo de las variables del método OSNA que consigan demostrar su relevancia clínica, se podrá depurar la metodología, aumentando así su eficiencia en cuanto a gestión de recursos. Si, como en el cáncer de mama, la carga tumoral total presenta altos valores predictivos, la importancia de contabilizar el número de GLs con enfermedad metastásica puede verse relegada. Esto conllevaría a la posibilidad de poder analizar muestras de manera agrupada, o en *pooling*, pudiendo disminuir el gasto de recursos de laboratorio de manera dramática.

Uno de los mayores retos de la estadificación molecular del cáncer de colon es su enfrentamiento con los conceptos de estadificación y paradigmas de tratamiento actuales. En el cáncer de mama estos protocolos intentan valorar de la manera más adecuada posible los resultados positivos de las técnicas de ultraestadificación<sup>9,185</sup>. Al contrario, el cáncer de colon sigue basado en la valoración dicotómica de presencia-ausencia de enfermedad metastásica en GLs, al menos en gran parte en referencia a la toma de decisiones clínicas y de tratamiento adyuvante<sup>3,9,15</sup>.

Los resultados observados con el uso de técnicas moleculares de alta sensibilidad no hacen sino, en esencia, mostrar la complejidad de la patología y biología humana. El falso positivo en una prueba de este tipo en relación a la consecuencia clínica evaluada no muestra sino nuestra

limitación de identificar correctamente todas las variables predictoras de esta y otras enfermedades, y de poder correlacionarlas de manera óptima.

Debido al gran volumen de intervenciones en el seno del carcinoma de colon, tanto diagnósticas como terapéuticas, las futuras medidas aplicadas supondrán un gran impacto económico y de recursos. Todos los avances necesitan demostrar una patente relevancia clínica. Debido a ello en la actualidad ninguna alternativa de estadificación histológica del carcinoma de colon ha sido considerada viable dentro del ámbito sanitario, por el momento.

